

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Papel do Óxido Nítrico Sintase e sua regulação nos tumores ginecológicos
(Fibromiomas e carcinomas do colo do útero)**

Mestrado Biologia Humana e Ambiente

Patrícia Alexandra Certainho Pires

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Maria Clara Bicho, Instituto de Medicina Molecular

Professora Doutora Deodália Dias, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

2017

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Papel do Óxido Nítrico Sintase e sua regulação nos tumores ginecológicos
(Fibromiomas e carcinomas do colo do útero)**

Mestrado Biologia Humana e Ambiente

Patrícia Alexandra Certainho Pires

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Maria Clara Bicho, Instituto de Medicina Molecular

Professora Doutora Deodália Dias, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

2017

Notas prévias

O seguinte trabalho segue as normas aplicadas na revista GENETICS (Referências bibliográficas).

Comunicações no âmbito do trabalho

Certainho, P., Matos, A., Gil, Â., Pereira da Silva, A., Inácio, Â., Pisco, J. M., Medeiros, R., Bicho, M., Bicho, M. C., 2016. “**Role of nitric oxide and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in gynaecologic tumors**”, YES Meeting Young European Scientist Meeting, 15 – 18 setembro, Porto. (Poster).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais,
pai José da Graça e mãe Filomena.

Começo por agradecer ao Professor Doutor Manuel Bicho, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Lisboa e Diretor do Laboratório de Genética, pela oportunidade para realizar este trabalho.

Queria, igualmente, agradecer à Professora Doutora Maria Clara Bicho e à Professora Deodália Dias pela orientação externa e interna, respetivamente, bem como pela disponibilidade e ajuda prestadas.

Ao Professor Doutor João Pisco do Hospital *St. Louis*, e ao Professor Doutor Rui Medeiros do Instituto de Oncologia do Porto por terem disponibilizado as amostras biológicas das doentes para este estudo e por toda a disponibilidade e ajuda prestadas no decorrer deste projeto.

Aos colaboradores do Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina, Andreia Matos, Professora Doutora Ângela Inácio e Doutora Joana Ferreira, Doutora Ana Luisa Silva e equipa, Ângela Gil e Téc. Conceição Afonso pelo apoio prestado ao longo do ano, com conselhos, organização das bases de dados, orientação e supervisão laboratorial.

Ao Instituto Bento da Rocha Cabral pelo financiamento parcial deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer aos restantes colegas de mestrado e de curso, por todos os momentos que vivemos.

Aos melhores sobrinhos, José Pedro e Benedita.

À restante família, mana Sílvia, Pedro, avó Lourdes e avó Margarida, por todo o apoio e carinho que sempre prestaram. E, não esquecendo, aos meus avôs, António Certainho e António Pires.

Por fim, à Ana, ao André, à Inês, à Marta, à Patrícia e ao meu afilhado Rafael, bem como a todos os meus amigos e colegas, que me apoiaram nesta fase importante.

Obrigada por tudo!

ABSTRACT

Uterine fibromyomas, also known as leiomyomas or fibroids, are benign smooth muscle tumors of the uterus, the most frequent benign tumors at the reproductive age. Although the etiology is unclear, sexual steroids, ethnicity, family history, and parity are considered relevant factors for their development. Associated morbidity and the excessive costs for the health systems represent crucial factors in the establishment of novel studies explaining their genesis and the development of the available techniques for their treatment. One of those techniques is embolization of the uterine fibroids, an efficient method, with minor risks after procedure. Concerning cervical cancer, although the preventive procedures are implemented, still it is one of the most common at reproductive age. In this case, HPV infection is needed but not sufficient for this pathology development, many cofactors have been identified, like, smoke habits, parity, infections with other infectious agents, number of sexual partners, between many others. Due to the large incidence of these 2 types of tumors, it is important to study the mechanisms involved, to evaluate the efficiency of the treatment techniques and to explain the genetic susceptibilities that contribute to their pathogenic development.

Functional polymorphisms in the genes NOS2/iNOS, NOS3/eNOS and MTHFR are involved in the modulation of several events such as angiogenesis, apoptosis, cell cycle, DNA methylation, that are crucial factors for the tumors biology. In this project, it was intended to elucidate the potential role of genes involved in oxide nitric synthase (NOS2/iNOS, NOS3/eNOS) and the related folate metabolism (MTHFR), in the development of these 2 types of tumors. It was also intended to evaluate the importance of several parameters related to the embolization.

Concerning fibromyomas results showed: **1)** they are more common at reproductive age, preferentially multiple, being the intramural type the most represented; **2)** that 1-2 and ≥ 3 pregnancies represent protection (OR = 0,009 [0,0001-0,06], $p < 0,001$; OR = 0,019 [0,0002-0,15], $p < 0,001$; respectively); **3)** there are significant differences in parameters involving in the efficiency of embolization – namely the reduction of 50% in the dominant fibromyoma volume and 34% in the uterine volume, after the embolization (6 months), a 91% of ischemia in general; **4)** there are a slight tendency ($p = 0,061$) for influence in the development of this tumors of the polymorphism present at intron 16 (+88G>T) in NOS2, with no significance values for the odd ratios ($p = 0,065$) and significant difference between allelic frequencies ($p = 0,024$) with T allele (OR=0,44 [0,21-0,91]) more associated with the protection effect ($p = 0,028$); **5)** for the polymorphism present at MTHFR gene (C677T) was significant different between genotype distribution and allelic frequencies ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectively), with CT+TT (OR = 0,45 [0,29-0,69] and the T allele (OR = 0,54 [0,39-0,77], $p < 0,001$) more associated with the protection effect for fibromyomas development ($p < 0,001$). Nevertheless, when we use a population African control results are contradictory, with CT+TT (OR = 2,04 [1,4-3,1], $p = 0,001$) and the T allele (OR = 2,7 [1,9-3,9], $p < 0,001$) more associated with risk effect for fibromyomas development.

Regarding cervical cancer sample of the population we obtained the following significant results: **1)** smoking habits represent a risk 5,7 times higher for the development of cervical cancer (OR=5,7 [2,86-11,2], $p < 0,001$); **2)** more of 1-2 pregnancies represent protection (OR= 0,024 [0,003-0,186], $p < 0,001$) compared with the pathology; **3)** for the polymorphism (27-bp VNTR) present at NOS3/eNOS gene, show a significant difference between genotype distribution ($p = 0,032$), with no significance values for the odd ratios. For the other studied polymorphisms,

we didn't find significant differences between fibromyomas and cervical cancer compared with controls ($P>0,05$).

This work represents a contribution for the importance of studies of the embolization technique and involves the first approach influence of polymorphism variation of these genes in the development of fibromyomas. For cervical cancer, this study also reinforces the need for more research about the influence of the nitric oxide metabolism in this type of cancer.

Keywords: Gynecological tumors, NOS2, NOS3, MTHFR, EFU

RESUMO

Os fibromiomas uterinos, leiomiomas ou fibróides, são tumores benignos do músculo liso uterino, sendo mais comuns durante a idade reprodutiva. Apesar da sua etiologia pouco clara, os esteróides sexuais, a etnia, o histórico familiar e a paridade, são alguns dos fatores associados ao seu desenvolvimento. A morbidade e os elevados custos para os sistemas de saúde revelam a importância dos estudos que envolvem a sua gênese e as técnicas de tratamento disponíveis. Uma dessas técnicas é a embolização dos fibromiomas uterinos, que tem revelado ser eficiente e resulta, em norma, em menores riscos pós-procedimento. O carcinoma do colo do útero, apesar das medidas preventivas, ainda é considerado um dos câncers mais comuns em idade reprodutiva. A infecção por HPV é necessária, mas não suficiente para o seu desenvolvimento, estando vários cofatores atualmente identificados, como os hábitos tabágicos, a paridade, as infecções com outros agentes infecciosos e o número de parceiros sexuais, entre outros. Devido à larga incidência e prevalência destes 2 tipos de tumores, é importante estudar os mecanismos que estão envolvidos na sua patogénia, avaliar as técnicas que vão surgindo, assim como identificar alguns aspetos da suscetibilidade genética para o seu desenvolvimento e progressão.

Polimorfismos funcionais nos genes NOS2/iNOS, NOS3/eNOS e MTHFR modulam aspetos da tumorigénese como a angiogénese, a apoptose, o ciclo celular e a regulação e epigenética por metilação do ADN, fatores marcantes da biologia dos tumores, quer benignos quer malignos. Neste projeto, pretendeu-se, elucidar o papel de genes envolvidos na síntese de óxido nítrico (NOS2/iNOS, NOS3/eNOS) e no metabolismo do folato (MTHFR) no desenvolvimento e progressão de ambas as patologias, assim como analisar os parâmetros relacionados com o sucesso da técnica de embolização em mulheres com fibromiomas.

Verificaram-se resultados significativos para algumas análises entre os parâmetros fenotípicos e as variantes genéticas, para ambas as patologias. Para a população composta por mulheres com fibromiomas, verificaram-se os seguintes resultados: **1)** são tumores benignos mais prevalentes em idade fértil, múltiplos e os intramurais são os mais comuns; **2)** o número de 1-2 e ≥ 3 gravidezes associam-se a proteção (OR = 0,009 [0,0001-0,06], $p < 0,001$; OR = 0,019 [0,0002-0,15], $p < 0,001$; respetivamente); **3)** diferenças significativas nos parâmetros resultantes do efeito da técnica de embolização dos fibromiomas – tais como, a redução de 50% na mediana do volume do fibromioma dominante e de 34% no uterino; o valor da mediana para o grau de isquemia obtido foi de 91%. **4)** encontrou-se uma tendência ($p = 0,061$) para diferença na distribuição genotípica do polimorfismo presente no intrão 16 (+88G>T) do gene NOS2/iNOS2 relativamente aos controlos, sem valores significativos para o risco associado ($p = 0,065$) e diferenças significativas para a distribuição alélica ($p = 0,024$) com o alelo T (OR = 0,44 [0,21-0,91] associado a proteção ($p = 0,028$); **5)** encontraram-se diferenças significativas na distribuição genotípica e alélica ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respetivamente) para o polimorfismo, C677T, do gene MTHFR, com CT+TT (OR = 0,45 [0,29-0,69] e do alelo T [OR = 0,54 [0,39-0,77], $p < 0,001$) - associando-se a proteção no desenvolvimento de fibromiomas. Apesar disso, quando recorremos a uma população controlo de origem Africana, para CT+TT (OR = 2,04 [1,4-3,1], $p = 0,001$) e para o alelo T (OR = 2,7 [1,9-3,9], $p < 0,001$) mais associado a risco no desenvolvimento de fibromiomas.

Para a população composta por mulheres com carcinoma do colo do útero, verificaram-se os seguintes resultados: **1)** os hábitos tabágicos representam um risco 5,7 vezes superior no desenvolvimento de carcinoma do colo do útero (OR = 5,7 [2,86-11,2]), $p < 0,001$, relativamente

às mulheres sem hábitos tabágicos. **2)** o número de 1-2 gravidezes representam proteção (OR= 0,024 [0,003-0,186]), $p < 0,001$; **3)** encontraram-se diferenças significativas na distribuição genotípica ($p=0,032$) do polimorfismo presente no intrão 4 do gene da NOS3/eNOS – apesar disso, sem valores significativos para o risco associado. Para os restantes polimorfismos estudados, não se encontraram diferenças significativas entre as populações consideradas.

Este trabalho é uma contribuição para uma primeira abordagem genética para os polimorfismos considerados, tanto quanto se conhece na literatura, para os fibromiomas. Também reporta uma potencial influência do metabolismo do folato no desenvolvimento de fibromiomas. Para o carcinoma do colo do útero, representa um contributo para a investigação do papel do óxido nítrico na sua biologia é necessária e reforça a importância do seu estudo devido ao seu papel multifatorial e complexo.

Palavras-chave: Tumores ginecológicos, NOS2, NOS3, MTHFR, EFU

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
ABSTRACT	ii
RESUMO	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
ABREVIATURAS E SIMBOLOS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Útero – Anatomia geral.....	2
1.2 Tumores – Características gerais.....	2
1.3 Fibromiomas uterinos.....	3
1.3.1 Características gerais.....	3
1.3.2 Epidemiologia	3
1.3.3 Etiologia	4
1.3.4 Sintomas, diagnóstico e tratamento.....	5
1.3.4.1 EFU - Embolização dos fibromiomas uterinos	6
1.4 Carcinoma do colo do útero	6
1.4.1 Características gerais.....	6
1.4.2 Epidemiologia: HPV-Carcinoma do colo do útero	7
1.4.2.1 Etiologia, HPV e progressão	8
1.4.3 Sintomas, diagnóstico e prevenção	10
1.5 Metabolismo e funções do óxido nítrico.....	11
1.5.1 Síntese, função e regulação	11
1.5.2 Polimorfismos das sintases do Óxido Nítrico (NOS).....	12
1.5.2.1 NOS2/iNOS (Sintase do óxido nítrico induzível)	12
1.5.2.1.1 Do Intrão 16 +88 G>T (rs9282801)	13
1.5.2.1.2 Do Exão 16 +14C>T; Ser608Leu (rs2297518)	13
1.5.2.2 NOS3/eNOS (Sintase do óxido nítrico endotelial).....	13
1.5.2.2.1. Do 27bp-VNTR no Intrão 4 (4b/a).....	13
1.6 Metabolismo e função da Redutase metilenotetrahidrofolato (MTHFR).....	14
1.6.1 Regulação da expressão e função do MTHFR	14
1.6.2 Polimorfismos da Redutase metilenotetrahidrofolato (MTHFR).....	15
1.6.2.1. Do C677T (rs1801133)	16
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Populações.....	20

3.1.1 Caracterização das populações	20
3.2 Metodologia	20
3.2.1 Colheita e tratamento das amostras biológicas.....	20
3.2.2 Extração de ADN	21
3.2.3 Quantificação de ADN	21
3.2.4 Amplificação e genotipagem do ADN	21
3.2.4.1 Polimorfismos da NOS2/iNOS (Intrão 16 – +88G>T, rs9282801; Exão 16 – +14C>T, rs229718).....	21
3.2.4.2 Polimorfismo da NOS3/eNOS (27bp-VNTR)	22
3.2.4.3 Polimorfismo C677T do MTHFR (rs1801133).....	22
3.2.5 Análise Estatística	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Caracterização das populações.....	25
4.1.1 População de mulheres com fibromiomas embolizados	25
4.1.2 População de mulheres com carcinoma do colo do útero	27
4.2 Análise dos polimorfismos da Sintase do NO induzível (NOS2/iNOS)	29
4.2.1 Polimorfismo no Intrão 16 (+88G>T) (rs9282801) nos fibromiomas embolizados ..	29
4.2.2 Polimorfismo no Exão 16 (+14C>T) da iNOS/NOS2 (rs2297518) nos fibromiomas embolizados.....	30
4.3 Análise do polimorfismo da Sintase do NO constitutiva (NOS3/eNOS).....	31
4.3.1 Polimorfismo do Intrão 4a/b (27bp-VNTR) nos fibromiomas embolizados.....	31
4.3.2 Polimorfismo do Intrão 4a/b (27bp-VNTR) no Carcinoma do colo do útero	32
4.4 Análise do polimorfismo (C677T) da Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR).....	33
4.4.1 MTHFR (C677T) (rs180113) nos fibromiomas embolizados.....	33
4.4.2 – Polimorfismo (C677T) da Metilenotetrahidrofolato redutase (rs1801133) no Carcinoma do colo do útero	35
4.5 Análise estatística da relação entre os parâmetros clínicos e os genéticos para a população de mulheres com fibromiomas embolizados.....	36
5. DISCUSSÃO	37
5.1 Discussão dos resultados da população de mulheres com fibromiomas	38
5.1.1 Discussão da influência genética nos fibromiomas.....	40
5.2 Discussão dos resultados da população de mulheres com carcinoma do colo do útero	44
5.2.1 Discussão da influência genética no carcinoma do colo do útero	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
8. ANEXOS	70
Anexo I – Imagens Suplementares.....	70

Anexo II – Consentimento Informado	71
Anexo III – Protocolos Extração de ADN e tampões de PCR	72
A. Protocolo de extração pelo método de Salting-Out.....	72
B. Reagentes da extração de ADN.....	72
C. Tampão de PCR e TAE 10x.....	73
Anexo IV - Análise Genética e Tabelas Suplementares.....	73
A. Perfil eletroforético do polimorfismo do Intrão 16 (+88G>T) (rs9282801).....	73
B. Perfil eletroforético do polimorfismo do Exão 16 (+16C>T) (rs2297518)	73
C. Perfil eletroforético do polimorfismo 27-bp VNTR do intrão 4 (4b/a)	74
D. Perfil eletroforético do polimorfismo C677T (1801133).....	74
Tabela Suplementar 8.1	75
Tabela Suplementar 8.2	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Genoma do papiloma vírus humano (HPV)	8
Figura 1.2 Localização no epitélio pavimentoso dos principais estádios do ciclo de vida do papiloma vírus humano	9
Figura 1.3 Via de síntese do óxido nítrico	11
Figura 1.4 Esquema simplificado do metabolismo do folato, envolvendo a síntese e a metilação do ADN	14
Figura Suplementar 8.1 Localização dos fibromiomas uterinos	71
Figura Suplementar 8.2 Embolização das artérias uterinas	71
Figura Suplementar 8.3 Perfil eletroforético de uma reação de PCR-RFLP para o polimorfismo presente no intrão 16 do gene NOS2/iNOS em gel de agarose (rs9282801)	74
Figura Suplementar 8.4 Perfil eletroforético de uma reação de PCR-RFLP para o polimorfismo presente no exão 16 do gene NOS2/iNOS em gel de agarose (rs2297518)	74
Figura Suplementar 8.5 Perfil eletroforético de uma reação de PCR para o polimorfismo presente no intrão 4 do gene NOS3/eNOS em gel de agarose	75
Figura Suplementar 8.6 Perfil eletroforético de uma reação de PCR-RFLP para o polimorfismo C677T do gene MTHFR em gel de agarose (rs1801133)	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1 Caracterização dos parâmetros clínicos da população de mulheres com fibromiomas	25
Tabela 4.2. Classes de gravidezes para a população de mulheres com fibromiomas e população controle	26
Tabela 4.3 Correlação de Spearman para os parâmetros clínicos da população de mulheres com fibromiomas	27
Tabela 4.4 Caracterização dos parâmetros obtidos da população mulheres com carcinoma do colo do útero e população controle	28
Tabela 4.5 <i>Odds Ratio</i> associados às classes de gravidezes e hábitos tabágicos para a população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controle	28
Tabela 4.6 Distribuição genotípica, frequências alélicas e <i>Odds ratio</i> do polimorfismo NOS2-Intrão16 na população de mulheres com fibromiomas e população controle	29
Tabela 4.7 Distribuição genotípica, frequências alélicas e <i>Odds ratio</i> do polimorfismo NOS2-Exão16 na população de mulheres com fibromiomas e população controle	31
Tabela 4.8 Distribuição genotípica, frequências alélicas e <i>Odds Ratio</i> do polimorfismo NOS3-Intrão4a/b na população de mulheres com fibromiomas e população controle	32
Tabela 4.9 Distribuição genotípica, frequências alélicas e <i>Odds Ratio</i> do polimorfismo Intrão4a/b-NOS3 na de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controle	33
Tabela 4.10 Distribuição genotípica, frequências alélicas e <i>Odds Ratio</i> do polimorfismo C677T do gene MTHFR na população de mulheres com fibromiomas e população controle	34
Tabela 4.11 Distribuição genotípica, frequências alélicas e <i>Odds Ratio</i> do polimorfismo C667T do gene MTHFR na de mulheres com fibromiomas e população controle africana	35
Tabela 4.12 Distribuição genotípica, frequências alélicas e <i>Odds Ratio</i> do polimorfismo C667T do gene MTHFR na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controle	36
Tabela Suplementar 8.1 Análise da distribuição dos parâmetros clínicos nos genótipos obtidos para os polimorfismos da iNOS/NOS2 e eNOS/NOS3 na população de mulheres com fibromiomas embolizados	76
Tabela Suplementar 8.2 Análise da distribuição dos parâmetros clínicos nos genótipos obtidos para o polimorfismo da MTHFR na população de mulheres com fibromiomas embolizados	77

ABREVIATURAS E SIMBOLOS

°C	Graus celsius
%	Porcentagem
A	Adenina
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Células apresentadoras do antígeno, <i>Antigen-presenting cell</i>
ASC-US	Células atípicas de significado indeterminado, <i>Atypical cells of undetermined significance</i>
ASC-H	Células atípicas sem excluir HSIL, <i>Atypical squamous cells, cannot exclude HSIL</i>
B2	Riboflavina
B6	Piridoxina
B12	Cobalamina
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
bp	Pares de base
C	Citosina
Ca ²⁺	Cálcio
CaM	Calmodulina
CIN	Neoplasia intraepitelial cervical, <i>Cervical intraepithelial neoplasia</i>
cc	Centímetros cúbicos
CCU	Carcinoma do colo do útero
DIU	Dispositivo intrauterino
DHFR	Dihidrofolato redutase
DP	Desvio padrão
dTMP	Deoxitimidina monofosfato
E	Gene precoce
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFU	Embolização dos fibromiomas uterinos
eNOS/NOS3	Óxido nítrico sintase endotelial
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
FMN	Mononucleótido de flavina
FSH	Hormona folículo-estimulante
G	Guanina
Gc	Guanilato ciclase
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofina
GSH	Glutationo
H ₂ O	Água
HIF-1	Fator induzido por hipoxia
HCy	Homocisteína
HPV	Papilomavírus humano, <i>Human Papiloma Virus</i>
HSIL	Lesão intraepitelial de alto grau, <i>High-grade squamous intraepithelial lesion</i>
IC	Intervalo de confiança
IGF-1	Fator de crescimento
INFα	Interferão alfa
INFγ	Interferão gama

iNOS/NOS2	Óxido nítrico sintase induzível
IR	Resistência à insulina, <i>Insuline Resistance</i>
L	Gene tardio
LCR	Região de controlo longa, <i>Long control region</i>
LH	Hormona luteinizante
LPS	Lipossacarídeos
LSIL	Lesão intraepitelial de baixo grau, <i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
Máx	Máximo
mg	Miligramas
MgCl₂	Cloreto de magnésio
Min	Mínimo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato
MTR	Metionina sintase redutase
N₂O₂	Mistura de gases em hipóxia
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato reduzido
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
NHA	N-hidroxi-l-arginina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO_x	Nitritos + nitratos
O₂	Oxigénio
O²⁻	Superóxido
ONOO[·]	Peroxinitrito
OR	<i>Odds Ratio</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
p	<i>p-value</i>
p53	Proteína supressora tumoral
PCR	Reação em cadeia polimerase, <i>Polymerase chain reaction</i>
pRb	Proteína retinoblastoma
r	Coeficiente de correlação
Rb	Riboflavina
RFLP	<i>Polimorfismos de comprimento do fragment de restrição, Restriction fragment length polymorphism</i>
RNOS	Espécies reativas de nitrogénio
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SIL	Lesão intraepitelial escamosa, <i>Squamous intraepithelial lesion</i>
SHBG	Globulina transportadora de hormonas sexuais
SHMT	Serina Hidroximetiltransferase
SNP	Polimorfismo de nucleótido simples, <i>Single nucleotide polymorphism</i>
T	Timina
TAE	Tris-acetato-EDTA
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
THF	Tetrahidrofolato

TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TS	Timidilato sintase
U	Unidades
U¹	Uracilo
V	Volts
VEGF	Fator de crescimento endotelial
VIA	Inspeção visual com ácido acético, <i>Visual inspection with acetic acid</i>
VFDPós	Volume do fibromioma dominante depois da embolização dos fibromiomas
VFPré	Volume do fibromioma dominante antes da embolização dos fibromiomas
VUPós	Volume uterino depois da embolização dos fibromiomas
VUPré	Volume uterino antes da embolização dos fibromiomas
VNTR	Número variável de repetições em série, <i>Variable number tandem repeat</i>
pmol	Picomol
μl	Microlitro
μM	Micromolar
χ^2	Qui-quadrado

1. INTRODUÇÃO

1.1 Útero – Anatomia geral

O útero é um órgão de dimensão variável e essencial na reprodução humana, constituído por paredes espessas e contráteis, normalmente localizado na parte anterior da cavidade pélvica. Na sua porção superior localiza-se o corpo e na porção inferior, o colo do útero.

Na sua arquitetura básica é possível identificar 3 camadas, da periferia para a profundidade: a túnica serosa (perimétrio), a túnica muscular (miométrio) e a túnica mucosa (endométrio). O perimétrio corresponde ao peritoneu visceral, que reveste grande parte do útero; o miométrio, é composto por fibras musculares lisas dispostas em feixes, separados por fibras colagénicas; o endométrio é a camada que reveste internamente a cavidade do útero em contacto íntimo com o miométrio, que varia com o estímulo hormonal, apresentando durante o ciclo menstrual 3 fases distintas: a proliferativa, a secretora e a menstrual (Conceição, 2005).

1.2 Tumores – Características gerais

Designamos por tumor o conjunto de células que perderam a capacidade de responder aos mecanismos que controlam o seu crescimento e apresentam, por isso, um crescimento anormal. Podemos considerar 2 tipos de tumores (Radić *et al.* 2004):

- benignos – podem surgir em qualquer tipo de tecido, crescem localmente e tendem a causar lesões através de pressão/obstrução (por exemplo, os fibromiomas);
- malignos – subdivididos em *in situ*, quando são intraepiteliais e lá permanecem; e carcinomas, quando possuem capacidade invasiva do tecido conjuntivo. Estes tumores são dependentes de nutrientes providenciados pela corrente sanguínea e alguns possuem a capacidade de produzir proteínas que, à distância, estimulam a angiogénese, para além da capacidade de atingir outros tecidos através da produção de metástases.

Existem vários fatores, denominados de carcinogénicos, capazes de influenciar o desenvolvimento de tumores, principalmente os malignos. Estes fatores podem ser agentes químicos e/ou físicos, como por exemplo, a radiação (Radić *et al.* 2004). A interação entre os fatores intrínsecos e extrínsecos permite compreender a complexidade dos mecanismos envolvidos na tumorigénese e estabelecer padrões de risco, bem como desenvolver terapêuticas adequadas.

Durante o ciclo reprodutivo, a gravidez e a menopausa, o miométrio sujeita-se a alterações dimensionais e celulares, adaptando-se a várias condições fisiológicas e patológicas. Estas e outras alterações morfológicas são também encontradas em condições tumorais (Ligon e Morton, 2001; Ciarnela *et al.* 2011). Neste trabalho, focamos o nosso estudo em 2 tipos de tumores ginecológicos, benignos e malignos (fibromiomas e carcinomas do colo do útero, respetivamente).

1.3 Fibromiomas uterinos

1.3.1 Características gerais

Em 1783, Matthew Baille descreveu pela primeira vez os fibromiomas uterinos, também vulgarmente denominados por miomas, fibróides, leiomiomas, leiomiofibromas e fibroleiomiomas (Okolo, 2008). Os fibromiomas são tumores benignos que se geram a partir das células do músculo liso uterino ou, em determinados casos, das células que compõem os vasos sanguíneos que atravessam esse músculo, sendo compostos essencialmente por matriz extracelular que contém colagénio, fibronectina e proteoglicanos (Wallach e Vlakos, 2004; Parker, 2007; Simms-Stewart e Fletcher, 2012).

Estes tumores apresentam alta heterogeneidade, dada a grande variabilidade no seu tamanho, número (únicos a múltiplos) e localização, denominando-se (**Anexo I - Figura Suplementar 8.1**):

- intramurais – quando se desenvolvem dentro da parede uterina;
- submucosos – quando se desenvolvem a partir das células do miométrio que se localizam na transição entre o endométrio e o miométrio;
- subserosos – quando se desenvolvem na superfície externa da serosa;

Eventualmente, alguns fibromiomas podem desenvolver-se sob a forma de pedúnculo, designando-se fibromiomas pedunculados (Wallach e Vlakos, 2004; Khan *et al.* 2014).

1.3.2 Epidemiologia

Os fibromiomas são considerados os tumores ginecológicos benignos mais comuns nas mulheres em idade reprodutiva, pouco comuns antes da menarca e com tendência a regredir após a menopausa (Cramer e Patel, 1990; Wallach e Vlakos, 2004; Okolo, 2008; Zimmermann *et al.* 2012).

Os estudos epidemiológicos realizados nos últimos anos têm como pretensão avaliar fatores potencialmente envolvidos no seu desenvolvimento, tais como: a idade, a idade da menarca, a paridade, os hábitos tabágicos, a etnia, a dieta, a obesidade, os contraceptivos hormonais e o consumo de álcool e cafeína (Ross *et al.* 1996; Marshall *et al.* 1998; Chiaffarino *et al.* 1999; Baird *et al.* 2003; Flake *et al.* 2003; Baird *et al.* 2006; Parazzini *et al.* 2006; Parker, 2007; Wise *et al.* 2007; Laughlin *et al.* 2010).

Ainda assim, a maioria dos estudos apresenta resultados controversos, que carecem de mais investigação e discussão, havendo, no entanto, alguns fatores que recolhem consenso e unanimidade, tais como: a idade da menarca, devido à sua importância na exposição hormonal e, como tal, quanto mais precoce for a menarca maior parece ser o risco para o desenvolvimento de fibromiomas (Edwards *et al.* 2012); a etnia, uma vez que, os fibromiomas são mais comuns em mulheres de origem africana (Baird *et al.* 2003); a paridade, uma vez que, mulheres nulíparas apresentam maior risco associado, enquanto que o aumento do número de gravidezes tende a ser protetor (Doridot *et al.* 2001; Hanafi *et al.* 2005); predisposição genética, uma vez que os fibromiomas são 2.2-3.47 vezes mais frequentes em familiares de pessoas que desenvolveram estes tumores (Lumbiganon *et al.* 1995; Vikhlyayeva *et al.* 1995); a hipertensão, uma vez que,

mulheres hipertensas tendem a ter maior predisposição para desenvolver fibromiomas, sugerindo que os mecanismos envolvidos possam estar correlacionados (Luoto *et al.* 2001); a obesidade, uma vez que o excesso de gordura corporal promove alterações no metabolismo das hormonas esteroides, resistência à insulina (IR) e diminuição dos níveis de globulina transportadora de hormonas sexuais (SHBG) (Faerstein *et al.* 2001). A hiperinsulinemia associa-se a maiores níveis de fator de crescimento (IGF-1) e de fator de crescimento epidérmico, influenciando o desenvolvimento de fibromiomas através do aumento da secreção de hormonas ováricas e/ou atuando diretamente nas células do músculo liso do miométrio, promovendo a sua proliferação (Eckel *et al.* 2005; Hebbar *et al.* 2014).

Apesar de se terem identificado mecanismos que afetam a migração do espermatozóide, transporte do óvulo e implantação do embrião em mulheres com fibromiomas (Richards *et al.* 1998), correlacionar a patologia com infertilidade ainda é uma questão controversa (Somigliana *et al.* 2007). No entanto, a existência de fibromiomas pode influenciar o sucesso dos tratamentos de reprodução medicamente assistida (Farhi *et al.* 1995; Eldar-Geva *et al.* 1998; Stovall *et al.* 1998).

1.3.3 Etiologia

A grande maioria dos fibromiomas são assintomáticos tornando o estudo da sua génese e o do desenvolvimento de padrões de risco difíceis de extrapolar (Zimmermann *et al.* 2012). Ainda assim, sabe-se que têm uma forte dependência hormonal, visto que se desenvolvem durante os anos reprodutivos e tendem a regredir após a menopausa. Outro aspeto que apoia essa dependência é o uso de agonistas de GnRH no controlo dos fibromiomas, conduzindo à sua redução, uma vez que, a GnRH estimula a libertação de LH e FSH, que consequentemente conduzem à produção de esteroides sexuais (West *et al.* 1987; Conn e Crowley, 1994; Rein *et al.* 1995; Maruo *et al.* 2004; Ishikawa *et al.* 2010; Wise *et al.* 2016). Os estrogénios estimulam a expressão de fatores angiogénicos no miométrio e no tecido dos fibromiomas (Tal e Segars, 2013). Em projetos realizados anteriormente no nosso laboratório, verificou-se que as concentrações de estradiol eram mais elevadas nas mulheres com fibromiomas, apoiando a hipótese de que o seu desenvolvimento tem uma forte dependência hormonal (Castelão, 2014; Martins, 2014).

Nas últimas décadas, vários fatores surgiram como potencialmente envolvidos no desenvolvimento de fibromiomas, desde os genéticos e epigenéticos, aos hormonais (estrogénios, progesterona), fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, componentes de matriz extracelular e sistema imune (Matsuo *et al.* 1999; Arici e Sozen, 2000; Wynn e Barron, 2010; Fallowfield *et al.* 2007; Wegienka *et al.* 2012; Islam *et al.* 2013; Gallagher e Morton, 2016).

Uma das hipóteses apontadas para a formação dos fibromiomas sugere que, a hipóxia que ocorre no endométrio durante a menstruação poderá promover a transição de miócitos normais para anormais conduzindo à formação de fibromiomas, uma vez que as células respondem às lesões e/ou a isquemia com o aumento da proliferação celular. O efeito benéfico da paridade nos fibromiomas também apoia a contribuição da hipóxia porque representa uma diminuição dos ciclos menstruais (Zhou *et al.* 2011).

O processo inflamatório também surge como um potencial fator de risco; uma vez que, mulheres com infecções, quer relacionadas com o uso de dispositivo intrauterino (DIU) quer por Clamídia, têm maior risco de desenvolver fibromiomas (Abdulkader *et al.* 2002).

Os fibromiomas podem tornar-se malignos e agressivos (sarcomas), mas é extremamente raro (<0,1%), dado que a maioria dos últimos surge *de novo*, maioritariamente em mulheres pós-menopáusicas (Morton, 1998).

1.3.4 Sintomas, diagnóstico e tratamento

Os sintomas variam consoante a localização e o tamanho dos fibromiomas, nomeadamente no que se refere a padrões hemorrágicos anormais, a pressão, a dor na região pélvica, ao surgimento de massas na zona pélvica, a complicações obstétricas, a malignidade e a associações raras (ascite, policitemia, síndromes familiares) (Coronado *et al.* 2000; Fleischer *et al.* 2008; Sabry e Al-Hendy, 2012).

A sua deteção, principalmente os de maiores dimensões, pode ocorrer através de exame ginecológico, sendo necessário recorrer a técnicas de imagiologia para um diagnóstico definitivo, bem como, fazer diagnóstico diferencial para excluir outras patologias como as neoplasias ováricas, os abscessos salpingo-ováricos, a endometriose e anomalias congénitas (Fields e Neinstein, 1996; Parker, 2007).

As estratégias de abordagem são individualizadas, uma vez que dependem de características como a gravidade dos sintomas, a localização, o tamanho, o número de lesões e têm em conta fatores médicos e sociais, incluindo a idade, a paridade, o desejo/vontade de gravidez futura, a possibilidade de malignidade, a proximidade cronológica da menopausa e o desejo de preservação uterina (Khan, 2014).

A terapia poderá ser expectante (vigia), médica ou cirúrgica. Na terapia médica o recurso a anovulatórios orais, análogos da hormona libertadora das gonadotrofinas (GnRH), progestagénicos, anti-progestagénicos e anti-inflamatórios não esteroides (AINE's), permitem um controlo eficaz dos fibromiomas uterinos (Maheux *et al.* 1985; Sankaran e Manyonda, 2008; Zimmermann *et al.* 2012). Contudo, apesar das vantagens, existem efeitos secundários associados, tais como: o défice profundo de estrogénios, a diminuição da densidade mineral óssea, sintomas menopáusicos e amenorreia (Wallach e Vlakos, 2004) – fazendo da terapia médica uma abordagem/medida mais comumente temporária em mulheres na peri-menopausa ou como estratégia de redução dos tumores antes da cirurgia (Goodwin *et al.* 1999); na terapia cirúrgica, as técnicas mais comuns são a histerectomia e a miomectomia. Na histerectomia, na qual se recorre à excisão total do útero – sendo, por isso, um tratamento definitivo – verificam-se consequências sérias na fertilidade da mulher. Por outro lado, a miomectomia permite preservar a fertilidade, funcionando como uma alternativa. (Ravina *et al.* 1995). Apesar da maior preservação uterina, a miomectomia associa-se ao aumento de perdas sanguíneas, da duração cirúrgica, da dor, da morbilidade pós-cirúrgica e dos períodos de permanência hospitalar face à histerectomia. Cerca de vinte a 25% das mulheres sujeitas a miomectomia acabam por necessitar de uma histerectomia (Goodwin *et al.* 1997; Goodwin *et al.* 1999; Simms-Stewart e Fletcher, 2012). Existem outras opções disponíveis, nas quais se inclui a embolização dos fibromiomas uterinos (EFU), entre outras, como a ecografia de alta frequência, o recurso a laser, a crioterapia

e a termo-ablação (Wallach e Vlakos, 2004; Sabry e Al-Hendy, 2012; Simms-Stewart e Fletcher, 2012).

1.3.4.1 EFU - Embolização dos fibromiomas uterinos

Na década de 90, o Dr. Ravina sugeriu o recurso à embolização nos casos de fibromiomas uterinos sintomáticos (Ravina *et al.* 1995), uma vez que, já era utilizada com sucesso no tratamento de massas pélvicas hipervasculares de vários tipos, incluindo a gravidez abdominal, a gravidez cervical e malformações arteriovenosas (Goodwin *et al.* 1997). Desde então que vários estudos têm sido publicados demonstrando a eficácia deste procedimento na redução do volume dos fibromiomas, do útero e dos sintomas associados (Worthington-Kirsch *et al.* 1998; Goodwin *et al.* 1999; Pelage *et al.* 2000; Pron *et al.* 2003).

Esta técnica (**Anexo I - Figura suplementar 8.2**) consiste no bloqueio do suplemento sanguíneo dos fibromiomas através do recurso a agentes embólicos (Burbank, 2004; Simms-Stewart e Fletcher, 2012) que provocam isquemia e, consequentemente, a redução dos fibromiomas. Surge como boa alternativa aos procedimentos cirúrgicos anteriormente referidos, uma vez que é um procedimento pouco invasivo, permite preservar o útero e requer pouco tempo de recuperação (Goodwin *et al.* 1997; Godwin *et al.* 1999; Pisco *et al.* 2011).

Em relação à intervenção em futuras gravidezes, a técnica é aparentemente segura (Pisco *et al.* 2011). O impacto da utilização de radiação, do material permanentemente implantado e o seu possível efeito na fertilidade ainda são alvo de discussão, apesar de, aparentemente, não representarem grande perigo quando a técnica é realizada em condições normais (Goodwin *et al.* 1999; Andrews e Brown, 2000; Nikolic *et al.* 2000).

Os fibromiomas representam um problema de saúde pública devido ao seu impacto negativo na vida quotidiana, influenciando o comportamento sexual, social e laboral das mulheres afetadas; bem como, devido aos custos que representam para os serviços de saúde (Velebil *et al.* 1995; Zhao *et al.* 1999; Flynn *et al.* 2006; Cardozo *et al.* 2012), sendo a investigação dos mecanismos de desenvolvimento, fatores de risco e o desenvolvimento de novas terapêuticas crucial.

1.4 Carcinoma do colo do útero

1.4.1 Características gerais

A descoberta da relação entre a infeção pelo Vírus do Papiloma Humano (da sigla inglesa, HPV) e o desenvolvimento da patologia maligna no colo do útero teve de tal forma impacto na comunidade científica que resultou num prémio Nobel em 2008, atribuído ao Dr. Harald Zur Hausen (Franco *et al.* 2012).

O colo do útero é suscetível à infeção pelo HPV devido à sua exigência fisiológica, forte influência hormonal e/ou infeções por outros agentes. Em muitos países, a infeção por HPV é considerada a infeção sexualmente transmissível mais comum e o carcinoma do colo do útero um dos mais frequentes entre as mulheres, sendo a presença do vírus necessária, mas não suficiente para o seu desenvolvimento (Bosch *et al.* 2002; Jemal *et al.* 2011; De Martel *et al.* 2012; Forman *et al.* 2012).

O rastreio do carcinoma do colo do útero tem revelado sucesso em termos de redução da mortalidade, uma vez que permite uma maior deteção de cancro invasivos em fases precoces, bem como a deteção e tratamento de lesões pré-invasivas (Saslow *et al.* 2012; Hutter e Decker, 2016).

Apesar de cerca de 90% dos cancros associados a HPV ocorrerem no colo do útero (Forman *et al.* 2012) – sendo que, 2/3 representam carcinomas das células pavimentosas e 1/3 adenocarcinomas (Vizcaino *et al.* 1998) – existe também uma forte relação com o desenvolvimento de outros tumores malignos, nomeadamente na cavidade oral, na orofaringe, no ânus e no pénis (Frisch *et al.* 1997; D'Souza *et al.* 2007; Heideman *et al.* 2007; Alemany *et al.* 2015; Vaccarella *et al.* 2013).

1.4.2 Epidemiologia: HPV-Carcinoma do colo do útero

A infeção pelo HPV é a mais comum a nível global e a maioria dos indivíduos sexualmente ativos, de ambos os sexos, acabará por adquirir o vírus em algum período da sua vida com um risco associado de 50-80% (Koutsky, 1997; Walboomers *et al.* 1999; Forman *et al.* 2012). O HPV apresenta uma distribuição geográfica notável, com elevada prevalência no leste de África e nas Caraíbas, sendo menos comum na Austrália e na Ásia ocidental. As 3 variantes mais comuns (16, 18 e 45) possuem maior incidência em mulheres jovens, decrescendo com o aumento da idade. Apesar disso, há estudos que indicam a ocorrência de um 2º pico de incidência em mulheres com idade igual ou superior a 45 anos, podendo dever-se a alterações no sistema imune, a alterações nos comportamentos sociais e sexuais e/ou a efeitos específicos do período/coorte (De Sanjosé *et al.* 2007).

A maioria dos carcinomas do colo do útero ocorre em regiões subdesenvolvidas, sendo o risco 3-4 vezes mais elevado do que em regiões desenvolvidas (Canavan e Doshi, 2000; Ferlay *et al.* 2014; WHO, 2016). Anteriormente, foi considerado o 2º cancro mais frequente em mulheres (Brosch *et al.* 2002), sendo que, em 2012, com uma estimativa de 530 mil novos casos (WHO, 2016) e 266 mil mortes a nível mundial, passou a ser considerado o 4º cancro mais incidente, apenas ultrapassado pelos cancros da mama, do pulmão e do colón (Vaccarella *et al.* 2013).

A nível europeu, em 2012, estimaram-se cerca de 58 mil novos casos, representando o 6º cancro mais reportado em mulheres (Ferlay *et al.* 2013). Em Portugal, existem cerca de 4.7 milhões de mulheres em risco (≥ 15 anos) e estima-se que, por ano, sejam reportados cerca de 720 casos e 390 mortes, fixando-se a taxa de incidência em 13.1 a cada 100 mil mulheres (Bruni *et al.* 2016). A vacinação contra o HPV foi introduzida no país em 2009, sendo o carcinoma do colo do útero o 7º mais incidente (6º com maior mortalidade) e o 2º mais comum em mulheres em idade reprodutiva (15-44 anos) (Vaccarella *et al.* 2013; Bruni *et al.* 2016).

A redução a que temos assistido relaciona-se provavelmente com a boa aplicação de planos de ação preventivos nos sistemas de saúde, permitindo detetar lesões prematuramente, evitando a progressão para formas mais agressivas. Apesar de em 2016 a vacinação já se encontrar implementada em 65 países, na maioria dos países desenvolvidos, é necessário reforçar o apoio e aplicar programas preventivos em África e na Ásia, onde a incidência e a mortalidade ainda são muito elevadas (WHO, 2016a).

1.4.2.1 Etiologia, HPV e progressão

Ao contrário de outras infecções que também se associam ao desenvolvimento de patologias malignas, como as provocadas pela *Helicobacter pylori* e as hepatites B e C, o HPV é quase exclusivo de transmissão sexual (Forman *et al.* 2012). Existem centenas de variantes de HPV que se dividem em cutaneotrópicas e/ou mucosotrópicas. As variantes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 são as mais relevantes clinicamente, uma vez que, são as mais associadas a fenótipos malignos e, por isso, designadas por altamente carcinogénicas/oncogénicas. As variantes menos agressivas, que geralmente se associam ao desenvolvimento de verrugas, são a 6 e a 11 (Clifford *et al.* 2006; Snijders *et al.* 2006; Castellsagué, 2008; Stanley, 2010; Mirabello *et al.* 2016).

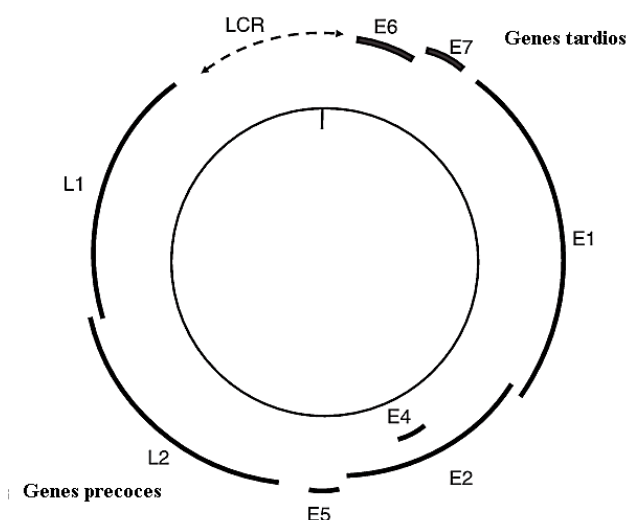


Figure 1.1 Genoma do papilomavírus humano (HPV). Estrutura circular de dupla cadeia com aproximadamente 8 Kb. 6 ORFs precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e 2 ORFs tardias (L1 e L2) (Adaptado de Narisawa-Saito e Kiyono, 2007).

As partículas de HPV consistem em moléculas de ADN circular com cerca de 8 Kb (**Figura 1.1**), em dupla hélice e protegidas por uma cápside constituída por 2 proteínas – L1 e L2. O genoma pode dividir-se em 3 regiões: uma região não codificante (LCR – *Long Control Region*) e duas unidades transcritas e traduzidas: a região precoce (E) e a região tardia (L). Na região precoce localizam-se genes (E1-E7) responsáveis pela replicação do ADN viral (E1 e E2), transcrição (E2), maturação e libertação das partículas (E4), transformação celular (E5, E6 e E7) e imortalização celular (E6 e E7). Na região tardia, como já referido, localizam-se genes (L1 e L2) responsáveis pela formação da cápside.

A região LCR (entre L1 e E6) envolve-se na regulação da replicação e expressão génica (Hausen, 1996; Munger *et al.* 2004; Munoz *et al.* 2006; Leto *et al.* 2011).

A oncoproteína E6 estimula a degradação da p53 – proteína supressora de tumores – inibindo a reparação do ADN e induzindo a apoptose. Por outro lado, a oncoproteína E7 inibe a pRb (proteína retinoblastoma) – proteína reguladora da divisão celular – envolvida no bloqueio da atividade de fatores de transcrição, conduzindo ao crescimento desregulado (Scheffner *et al.* 1990; Kumar *et al.* 2015).

As células normais do epitélio pavimentoso crescem de forma estratificada, com forte divisão celular na camada basal, resultante de células estaminais. Após a divisão, uma das células filhas migra no sentido do epitélio e passa por um processo de diferenciação, enquanto que as que permanecem na camada basal apresentam um baixo índice de actividade celular. Através da análise da **Figura 1.2**, é possível compreendermos como o vírus se estabelece no hospedeiro e como ocorre a transformação até formas agressivas (Munoz *et al.* 2006).

O HPV encontra-se extremamente adaptado aos tecidos do hospedeiro (constituído por células diferenciadas do epitélio da pele ou da mucosa) usando a sua maquinaria celular. As partículas virais afetam inicialmente a camada basal do epitélio através de microfissuras ou lesões e migram para o interior das células. Nas células infectadas, níveis residuais de ADN viral são sintetizados atingindo um número de cópias episomais de aproximadamente 50-100 genomas por célula. Os genes precoces, E1 e E2, suportam a replicação do ADN viral para que as células estaminais infectadas se possam manter na lesão por longo período de tempo (Munoz *et al.* 2006; Narisawa-Saito e Kiyono, 2007).

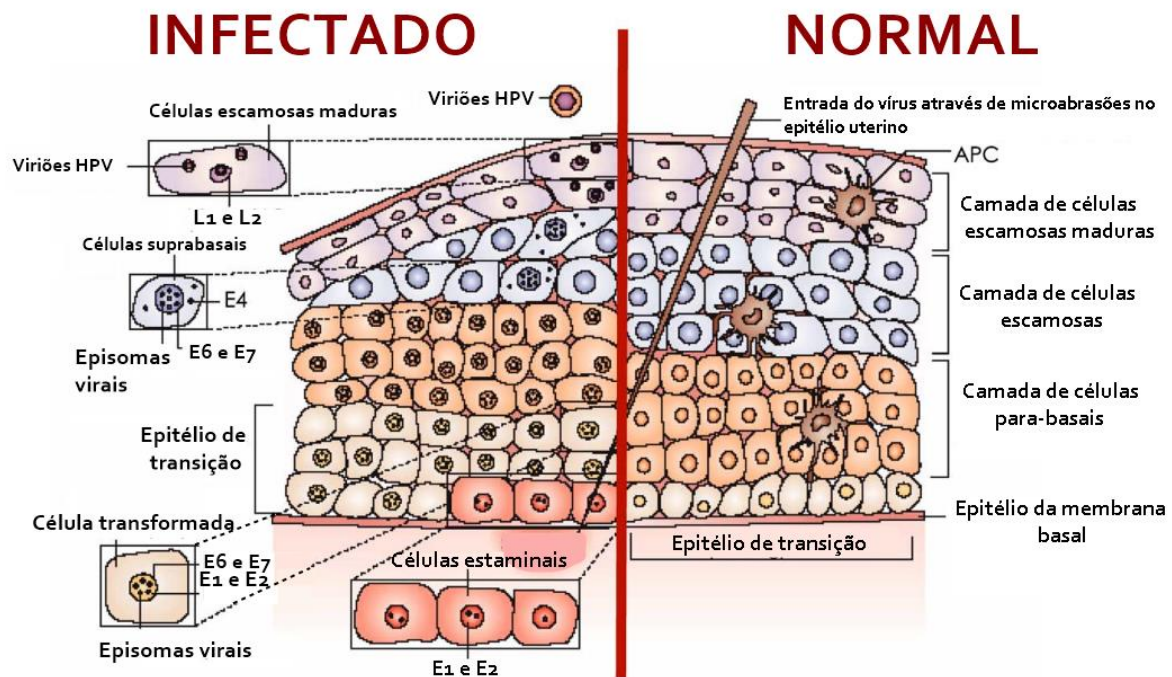


Figura 1.2 Localização no epitélio pavimentoso dos principais estádios do ciclo de vida do papiloma vírus humano (HPV). As células-filhas das células estaminais epiteliais dividem-se ao longo da membrana basal acabando por se maturar verticalmente através do epitélio sem mais divisões (lado direito da figura). Após a entrada do HPV, dá-se a introdução nas células estaminais na camada basal do epitélio e ocorre a expressão de proteínas virais não estruturais. Na presença destas, a população de células em divisão expande-se verticalmente, mas a diferenciação epitelial é reduzida, não se completando. Proteínas víricas são expressas ao longo da diferenciação e os viriões maduros são produzidos apenas nas camadas mais superficiais do epitélio (lado esquerdo da figura). As células apresentadoras do antígeno (APCs) são eliminadas no epitélio infectado pelo vírus (Adaptado à língua portuguesa de Muñoz *et al.* 2006).

Enquanto as células filhas infectadas migram para camadas superiores, os genes tardios (L) são expressos e iniciam uma fase vegetativa do ciclo, resultando em elevados níveis de amplificação do genoma viral. E5, E6 e E7 tornam o ambiente propício, chegando, por vezes, a induzir a síntese de ADN celular para evitar a apoptose. Nas camadas superiores do epitélio, o ADN viral é colocado em cápsides e os viriões são libertados tirando vantagem da desintegração das células epiteliais que ocorre como consequência da renovação natural das suas camadas superficiais. Como os viriões são produzidos nas camadas superiores do epitélio, escapam facilmente ao sistema imune. Este ciclo pode levar cerca de 2-3 semanas, o tempo que um queratinócito basal leva a diferenciar-se e a mover-se para as camadas superficiais (Munoz *et al.* 2006; Narisawa-Saito e Kiyono, 2007).

Da infecção ao desenvolvimento da neoplasia maligna podemos considerar 4 etapas: transmissão do HPV, persistência viral, progressão das células infetadas para lesões pré-cancerígenas e invasão (Schiffman *et al.* 2007). A integração do ADN viral no genoma nas células do hospedeiro é um evento raro, mas, quando ocorre, a transformação carcinogénica progride.

Contudo, apesar da maioria das mulheres ser infetada por HPV, geralmente não há progressão para carcinoma do colo do útero, verificando-se uma regressão das lesões nos meses seguintes devido à intervenção imunológica (Walboomers *et al.* 1999; Hausen *et al.* 2002). A patogénese do carcinoma do colo do útero parece estar, então, dependente de um variado leque de cofatores (Bosch *et al.* 2002; Castellsagué *et al.* 2002; Daling *et al.* 2002; Munoz *et al.* 2006), tais como: os ambientais/exógenos (por exemplo, o uso prolongado de contraceptivos hormonais, o consumo tabágico, a dieta, a paridade e a coinfeção com outros agentes sexualmente transmissíveis), os cofatores virais (infecção por outros agentes virais com potencial oncogénico do tipo de HPV(s), concentração viral e integração viral) e, ainda, os cofatores endógenos (hormonas endógenas, o uso de preservativo, parceiros múltiplos, o início precoce da atividade sexual e a genética) (Bosch *et al.* 2002; Castellsagué *et al.* 2002; Daling *et al.* 2002; Munoz *et al.* 2006; Bicho *et al.* 2009; Silva *et al.* 2013; Burchell *et al.* 2014; Roura *et al.* 2014).

1.4.3 Sintomas, diagnóstico e prevenção

Os sintomas, quando existentes, tendem a surgir nas fases mais avançadas do tumor e podem ser comuns a um variado leque de patologias. As mulheres com carcinoma do colo podem apresentar irregularidades menstruais, hemorragias vaginais anormais, dor na região pélvica, fadiga, perdas de peso e apetite, desconforto vaginal e/ou odores anormais (WHO, 2016a).

Atualmente, existem 3 técnicas de rastreio: citologia convencional/meio líquido, aspeto visual com recurso a ácido acético (da sigla inglesa, VIA) e o teste HPV para pesquisa de variantes de alto risco (WHO, 2016); a citologia permite detetar o crescimento anormal das células pavimentosas, denominando-se por neoplasia intraepitelial cervical (da sigla inglesa, CIN). O grau pode variar de 1 a 3, consoante a espessura do epitélio cervical composto por células anormais. Assim, à medida que a infeção persiste e se integra pode conduzir a precursores cancerígenos: neoplasia intraepitelial cervical moderada ou severa (das siglas inglesas, CIN2 e CIN3, respetivamente) ou adenocarcinoma *in situ* (da sigla inglesa, AIS) (Hutter e Decker, 2016; Zhao *et al.* 2016). Posteriormente, adotou-se o Sistema Bethesda, que classifica as lesões como lesões intraepiteliais pavimentosas (da sigla inglesa, SIL) – subdivididas em baixo grau e elevado grau (das siglas inglesas, LSIL e HSIL, respetivamente), células atípicas de significado indeterminado (da sigla inglesa, ASC-US), células atípicas sem excluir lesão intraepitelial de alto grau (da sigla inglesa, ASC-H) e carcinoma invasivo (Nayar e Wilbur, 2015).

Atualmente, já existem 2 vacinas profiláticas, a Cervarix® (GlaxoSmithKline, Brentford, UK) e a Gardasil® (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA); a Cervarix, apresentada em 2007, que abrange as variantes 16 e 18 e a Gardasil, que abrange as variantes 6, 11, 16 e 18 (2006) e, posteriormente (2014), as variantes 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. Ambas as vacinas revelam, para além da segurança e imunogenicidade, eficácia na prevenção de lesões neoplásicas cervicais na vagina, vulva e verrugas (Castellasaque, 2008; Dochez *et al.* 2014; Stanley, 2016).

No entanto, a vacinação exclusivamente feminina não é suficiente para alcançar o objetivo de reduzir, para níveis de infeção residuais, o número de indivíduos infetados. Apesar de

existirem países que já adotaram a vacinação em ambos os géneros, é necessário expandir a medida a nível mundial (Stanley, 2016).

1.5 Metabolismo e funções do óxido nítrico

1.5.1 Síntese, função e regulação

Em 1987, demonstrou-se que as células dos mamíferos possuem a capacidade de sintetizar óxido nítrico (NO), ou monóxido de azoto, tornando a molécula interessante para a comunidade científica. O óxido nítrico é uma molécula de efeitos pleiotrópicos, altamente reativa e com um tempo de semi-vida reduzido, que tem vindo a revelar ter um papel crucial em vários processos biológicos (Vallance e Collier, 1999).

Apresenta 3 isoformas de síntese: neuronal (NOS1/nNOS), induzível (NOS2/iNOS) e endotelial (NOS3/eNOS). Estas isoformas dividem-se em 2 categorias: constitutivas (NOS1/nNOS e NOS3/eNOS) e induzível (NOS2/iNOS). Enquanto que as formas constitutivas requerem cálcio (Ca^{2+}) e calmodulina (CaM), produzindo NO em baixas quantidades e por curtos períodos de tempo, a forma induzível (NOS2/iNOS) é independente de Ca^{2+} , induzida por macrófagos e outros tipos celulares após estimulação por endotoxinas (LPS), INF- γ , TNF- α , stresse oxidativo e outras citocinas, podendo originar elevadas quantidades de NO por longos períodos de tempo (Wink e Mitchell, 1998; Xu *et al.* 2002; Mattila e Thomas, 2014; Wu *et al.* 2014; Thomas *et al.* 2015). A produção de NO por parte das NOS pode ser regulada pelo próprio NO, através de modificações covalentes, interações com outras proteínas e pela disponibilidade dos cofatores, como por exemplo, o BH_4 – cofator crítico na síntese de NO (Alkaitis e Crabtree, 2012).

A sua síntese envolve 2 etapas (**Figura 1.3**); uma em que ocorre a hidroxilação da L-arginina para gerar N-hidroxi-L-arginina (NHA), com recurso a NADPH e oxigénio (O_2) e uma segunda etapa que consiste na conversão de NHA em NO e citrulina. Na reação são utilizados cofatores como a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e tetrahydrobiopterina (BH_4). (Dusse *et al.* 2003).

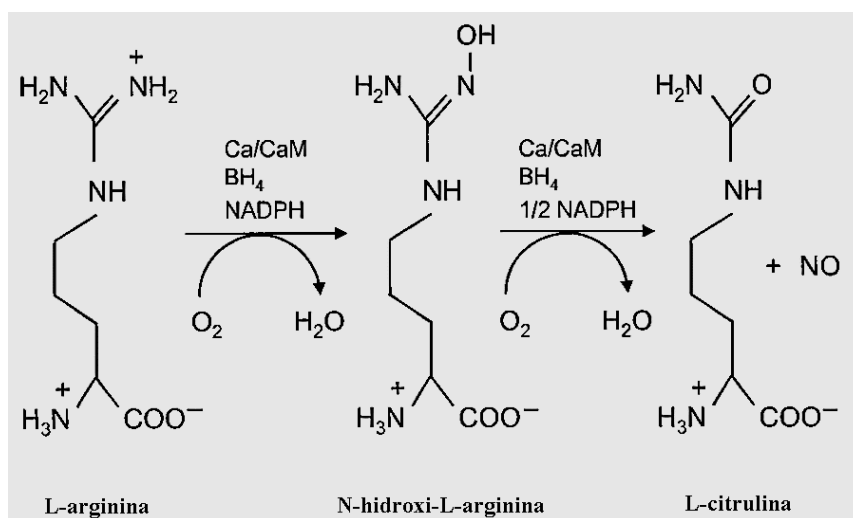


Figura 1.3 - Via de síntese do óxido nítrico. Através da oxidação da L-arginina origina-se NO e L-citrulina, com a formação do intermediário, N-hidroxi-L-arginina (NHA). BH_4 = tetrahydrobiopterina, Ca/CaM = cálcio/calmodulina (Adaptado à língua de Murad, 1999).

Os efeitos biológicos do NO, de forma simplificada, podem ser divididos em diretos e indiretos, assumindo-se como fatores determinantes no seu efeito biológico, a concentração e a fonte do NO (Fukumura *et al.* 2006; Yao *et al.* 2010; Wu *et al.* 2014). Quando em baixa concentração e libertado por curtos períodos de tempo, medeia principalmente efeitos diretos, enquanto que os efeitos indiretos ocorrem na presença de elevadas concentrações de NO por longos períodos de tempo (Espey *et al.* 2002).

Como efeitos diretos podemos considerar as reações químicas em que o NO reage diretamente com os alvos, nomeadamente proteínas que contêm grupo heme, como a guanilato ciclase (Gc), a oxihemoglobina e o citocromo P450. Por outro lado, como efeitos indiretos consideram-se reações que envolvem espécies reativas de nitrogénio (RNOS), como trióxido de dinitrogénio (N₂O₃) e peroxinítrito (ONOO⁻), que se formam através da interação do NO com o O₂ e O₂⁻. Os efeitos indiretos podem dividir-se em 2 categorias: stresse nitrosativo e stresse oxidativo (Wink e Mitchell, 1998).

Quando em elevadas concentrações, o NO interage com muitos metais de transição, proteínas com grupo heme e grupos tióis, que oxidam funcionalidades nos polinucleótidos e proteínas, conduzindo a quebras na cadeia de ADN. O NO pode mediar lesões no ADN de 3 formas: através da formação de nitrosaminas carcinogénicas, por modificações diretas e através da inibição de sistemas requeridos para a reparação de lesões no ADN mediadas por outras substâncias genotóxicas (Wink e Mitchell, 1998).

Por sua vez, também modula a regulação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), conduzindo ao aumento da árvore vascular, que, resultará num maior crescimento e, eventualmente, aumento da invasão e capacidade metastática de tumores (Xu *et al.* 2002). Ainda assim, as funções do NO na biologia dos tumores permanecem por esclarecer e várias linhas de investigação apontam como evidente, um efeito duplo do NO (Xu *et al.* 2002).

1.5.2 Polimorfismos das sintases do Óxido Nítrico (NOS)

Polimorfismos presentes nos genes responsáveis pela produção de NO, têm sido associados a várias patologias, incluindo o cancro (Unal *et al.* 2010), tornando pertinente o estudo da influência dos seus polimorfismos genéticos no desenvolvimento deste tipo de patologias.

1.5.2.1 NOS2/iNOS (Sintase do óxido nítrico induzível)

Representa a forma predominante de síntese de NO e tem o seu gene localizado no cromossoma 17 (17q11.2), constituído por 25 intrões e 26 exões (Nathan e Xie, 1994; Alderton *et al.* 2001). Ao contrário das outras duas isoformas, como já referido, não depende dos níveis de Ca²⁺ intracelular, sendo a sua transcrição regulada e induzida por citocinas inflamatórias, endotoxinas, hipóxia e stresse oxidativo (Fukumura *et al.* 2006).

O seu contributo para o desenvolvimento e progressão tumoral tem sido reportado em vários tumores, entre eles, o colorretal e da bexiga (Ryk *et al.* 2011). A NOS2/iNOS é considerada um biomarcador de fenótipos tumorais mais agressivos, ajudando a auferir o prognóstico. Pensa-se que a sua regulação poderá estar intimamente associada ao microambiente tumoral com destaque para as citocinas, hipóxia, privação de nutrientes e vários fatores metabólicos (Heinecke *et al.* 2014).

Neste trabalho, pretendeu-se verificar se 2 polimorfismos presentes no gene, Intrão 16 +88 G>T (rs9282801) e o Exão 16 +14 C>T (Ser608Leu, rs2297518) representam fatores de suscetibilidade/proteção no desenvolvimento dos tumores ginecológicos considerados.

1.5.2.1.1 Do Intrão 16 +88 G>T (rs9282801)

Este polimorfismo resulta de uma transição de G para T no intrão 16 +88G>T (rs9282801) (Heltianu *et al.* 2011). A sua função ainda não se encontra bem esclarecida, mas presume-se que afete a expressão génica e aumente a atividade enzimática da NOS2/iNOS, aumentando, consequentemente a síntese de NO. Os genótipos GT/TT parecem estar associados a um aumento do risco do cancro da próstata nos homens (Lee *et al.* 2009).

1.5.2.1.2 Do Exão 16 +14C>T; Ser608Leu (rs2297518)

Este polimorfismo resulta numa transição de C para T que origina a substituição de um aminoácido serina por leucina no codão 608 (Ser608Leu), conduzindo ao aumento da expressão da enzima e, consequentemente, dos níveis de NO. Referiu-se a sua influência na suscetibilidade a várias doenças, como por exemplo, hiperplasia benigna da próstata, melanoma e cancros do estômago e da bexiga (Yoo *et al.* 2010; Rik *et al.* 2011).

No entanto, apesar de significar maior risco, uma vez estabelecido o cancro, poderá manifestar-se como um fator de proteção. Esta resposta paradoxal, parece ser explicada pela dupla resposta ao NO, uma vez que o NO gerado através da NOS2/iNOS pode ter efeitos citoestáticos e/ou citotóxicos nas células tumorais, ao mesmo tempo que parece promover a angiogénese no tumor (Ryk *et al.* 2011). Assim, neste trabalho, pretendemos elucidar um potencial papel de suscetibilidade/proteção do polimorfismo no desenvolvimento dos tumores ginecológicos considerados.

1.5.2.2 NOS3/eNOS (Sintase do óxido nítrico endotelial)

O gene da NOS3/eNOS localiza-se no cromossoma 7 (7q16) e é constituído por 25 intrões e 26 exões (Robinson *et al.* 1993; Alderton *et al.* 2001), expressando-se nas células endoteliais e epiteliais, presentes numa grande variedade de tumores (Yao *et al.* 2010; Wu *et al.* 2014).

Atualmente, sabe-se que a NOS3/eNOS pode modular eventos como a angiogénese, a apoptose, o ciclo celular, a invasão e a metastização (Wu *et al.* 2014). Dos polimorfismos já identificados, alguns são apontados como tendo influência funcional e têm sido estudados em várias patologias (Unal *et al.* 2010).

Neste trabalho, pretende-se verificar a existência, ou não, da influência de um polimorfismo, 27-bp VNTR (4b/a), localizado no Intrão 4, no desenvolvimento dos 2 tipos de tumores ginecológicos considerados.

1.5.2.2.1. Do 27bp-VNTR no Intrão 4 (4b/a)

Estudos prévios indicam que indivíduos homozigóticos mutados, aa, apresentam menos 20% de nitritos e nitratos (NOx) circulantes face aos restantes genótipos, podendo indicar que,

apesar de se localizar num intrão, este polimorfismo poderá influenciar os níveis plasmáticos de NOx (Tsukada *et al.* 1998).

Diversos estudos correlacionam o polimorfismo com o desenvolvimento de cancro (Medeiros *et al.* 2001; Unal *et al.* 2010; Amasyali *et al.* 2012; Safarinejad *et al.* 2013; Diler e Öden, 2016) e infertilidade masculina (Safarinejad *et al.* 2010), assumindo-se que o polimorfismo poderá ter um efeito *cis*-regulador no promotor da NOS3/eNOS (Wang *et al.* 2002).

1.6 Metabolismo e função da Redutase metilenotetrahidrofolato (MTHFR)

A regulação da metilação do ADN é crucial na manutenção da expressão genética, *imprinting* genómico e diferenciação celular. Um dos genes que contribui para essa regulação é o gene que codifica a enzima MTHFR, localizado no cromossoma 1 (1p36.3), composto por 11 exões e 11 intrões (Goyette *et al.* 1994; Heijmans *et al.* 2003).

1.6.1 Regulação da expressão e função do MTHFR

A enzima MTHFR catalisa a redução biológica irreversível de 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metilenoTHF) em 5-metilTHF (5-metilTHF) (Figura 1.4) – forma predominante de folato em circulação e dador metilo para a síntese de metionina a partir da remetilação da homocisteína (Hcy), requerendo NADPH como dador de eletrões e FAD como cofator (Froese *et al.* 2016).

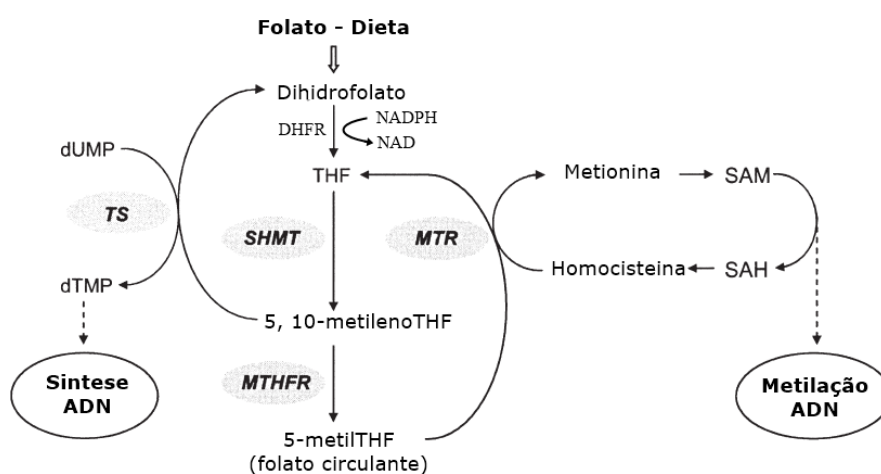


Figura 1.4 – Esquema simplificado do metabolismo do folato, envolvendo a síntese e metilação do ADN. O MTHFR é uma enzima crítica no metabolismo, responsável pela via irreversível da conversão de 5,10-metilenoTHF em 5-metilTHF, direcionando o folato para mediar a remetilação da homocisteína (Hcy) em metionina. Enzimas: TS, timidilato sintase; DHFR, dihidrofolato redutase; SHMT, serina hidroximetiltransferase; MTHFR, 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase; MTR, metionina redutase. Metabolitos: THF, tetrahidrofolato; dTMP, deoxitimidina monofosfato; dUMP, deoxiuridina monofosfato; SAH, S-adenosilhomocisteína; SAM, S-adenosilmetionina (Adaptado de Larsson *et al.* 2006).

Deste modo, a MTHFR é responsável pela redução dos níveis de Hcy no plasma (Bailey e Gregory, 1999; Ramkaran *et al.* 2015), sendo estes influenciados por fatores genéticos/ambientais, como o sexo, a idade e a ingestão de vitaminas (Souto *et al.* 2005), nomeadamente B2, B6 e B12, cofatores chave no metabolismo.

O folato é uma vitamina encontrada em diversos alimentos, como citrinos, vegetais, cereais e fígado, existindo 2 mecanismos estabelecidos pelos quais o folato pode ter influência no desenvolvimento de tumores: através da indução da incorporação de uracilo (U) no ADN ou causando metilação aberrante do ADN (Larsson *et al.* 2006). O défice alimentar em folato pode também ser suficiente para diminuir o número de grupos metilo e mesmo resultar na interrupção da capacidade de reparar o ADN, o que poderá conduzir a quebras na cadeia, promovendo mutações e apoptose (Miller *et al.* 1994; Wei *et al.* 2003).

O 5-metilTHF (folato circulante) providencia grupos metilo para a síntese de metionina e para a metilação do ADN, é requerido para a conversão de deoxirudilato em timidilato e pode, ainda, ser oxidado em 10-formilTHF para a síntese de purinas. Assume-se então que o 5,10-metilenoTHF é crítico na biossíntese de ADN, bem como a manutenção da quantidade de deoxinucleótido (Ma *et al.* 1997). Para além disso, tem também a capacidade de inibir a oxidação de BH₄ por parte do peroxonítrico, aumentando a sua disponibilidade para a síntese de NO (Stroes *et al.* 2000; Antoniadis *et al.* 2006).

O MTHFR faz parte de um metabolismo que relaciona várias reações biológicas que providenciam cofatores essenciais para a produção de S-adenosilmetionina (SAM) – principal dador metilo para a metilação, bem como grupos metilo para a metilação de dUMP em dTMP na síntese de ADN. Um baixo suplemento de grupos metilo induz a hipometilação do ADN (Rampersaud *et al.* 2000) bem como uma metilação deficiente de dUMP para dTMP, conduzindo a uma excessiva incorporação de uracilo nas cadeias de ADN (Kim *et al.* 2001).

1.6.2 Polimorfismos da Redutase metilenotetrahidrofolato (MTHFR)

A metilação do ADN é essencial para o desenvolvimento e poderá, indiretamente, conduzir à carcinogénese ou a outras condições anormais, tornando-se pertinente identificar fatores endógenos e exógenos que determinem os padrões de metilação (Friso *et al.* 2002).

A elevada concentração de Hcy associa-se a doenças, determinadas por fatores genéticos, fisiológicos, estilo de vida e pelo consumo de vitaminas do complexo B, como o folato, as cobalaminas, B6 e riboflavina, que funcionam como cofatores ou substâncias no metabolismo (Refsum *et al.* 1998; Hustad *et al.* 2000).

Verifica-se alguma disparidade nos estudos que pretendem aferir os efeitos dos polimorfismos presentes no gene em vários tipos de cancro. Se por um lado existem evidências de que o polimorfismo C677T estaria relacionado, por exemplo, com o desenvolvimento de cancro colorretal, também se referiu que essa relação perdia a significância quando o *intake* de folato era adequado (Marchand *et al.* 2005).

Para este trabalho, consideramos um dos polimorfismos mais estudados no gene, o C667T (rs1801133), de forma a aferir sobre uma potencial influência do polimorfismo no desenvolvimento das patologias consideradas.

1.6.2.1. Do C677T (rs1801133)

O SNP, localizado no exão 4 do gene MTHFR, é um dos polimorfismos mais estudados no gene, representando uma substituição de C para T, que resulta na substituição do aminoácido valina por alanina, conduzindo a uma forma termolábil da enzima e menor ligação às FADH₂ com consequente diminuição da sua atividade (Frosst *et al.* 1995; Lorenz *et al.* 2014).

Este polimorfismo apresenta uma distribuição geográfica heterogênea; sendo pouco prevalente nas regiões africanas (cerca de 2%), atingindo cerca de 10% dos caucasianos – chegando aos 20% em algumas populações italianas (Ueland *et al.* 2001).

Indivíduos homozigóticos mutados (TT) apresentam cerca de 30% da atividade normal da enzima, enquanto que os heterozigóticos (CT) apresentam 65%, quando comparados com os homozigóticos selvagens (CC) (Frosst *et al.* 1995). Também em comparação com os indivíduos selvagens (CC), os heterozigóticos (CT) e os homozigóticos mutados (TT) têm menos 10% e 18% de folato, respetivamente (Sharp e Little, 2004). O genótipo mutado (TT) associa-se a um elevado nível de Hcy, concluindo-se que os portadores possuem um estado de hipometilação, o que poderá estar relacionado com danos no ADN (Choi *et al.* 1998; Choi e Mason, 2002).

Perante baixos níveis de folato, a menor disponibilidade de 5-MTHF para a atividade da enzima mutada, diminui a conversão de homocisteína em metionina, resultando no aumento de homocisteína total (tHcy) (Friso e Choi, 2005). Contudo, um adequado *status* de folato faz com que não ocorram diferenças nas concentrações de homocisteína entre os 3 genótipos (Girelli *et al.* 1998).

A hipótese de que o polimorfismo poderá resultar em suscetibilidade baseia-se na reduzida atividade da MTHFR, uma vez que causa a dispersão de 5,10-metilenoTHF através da síntese de timidina. Esta distribuição diminui os rácios de dUMP/dTMP e, como consequência, a oportunidade do uracilo se incorporar no ADN (Crott *et al.* 2001; Blount *et al.* 1997). Uma reduzida atividade da variante termolábil também poderá ter um efeito positivo na síntese de nucleótidos, ao aumentar a disponibilidade de 5,10-metilenoTHF, requerido para a síntese de ADN e divisão celular.

A associação entre este SNP e a faixa etária parece ter um papel positivo na modulação do risco em mulheres com hábitos tabágicos e a receber terapêutica hormonal (Bicho *et al.* 2011).

Neste trabalho, devido ao facto deste polimorfismo ter ainda um papel controverso na biologia dos tumores, torna-se pertinente estudá-lo relativamente aos tumores considerados.

2. OBJETIVOS

- Estudar o papel das variantes polimórficas nos genes da NOS2/iNOS (rs2297518, rs9282801), da NOS3/eNOS (VNTR 27bp-4a/b) e da MTHFR (rs1801133), na suscetibilidade para as patologias consideradas;
- Estudar o papel das variantes polimórficas nos genes da NOS2/iNOS (rs2297518, rs9282801), da NOS3/eNOS (VNTR 27-4a/b) e da MTHFR (rs1801133), na modulação dos parâmetros clínicos obtidos na população de mulheres com fibromiomas embolizados;
- Verificar se a suscetibilidade é comum, ou não, para ambas as patologias (fibromiomas e carcinoma do colo do útero);
- Caracterização dos parâmetros clínicos observados (volume do fibromioma dominante e do útero – antes e após o procedimento; grau de isquemia obtido) em função da técnica de embolização das artérias uterinas (EFU);

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Populações

Para a realização deste estudo, recorreu-se a 3 populações:

- uma população composta por mulheres com fibromiomas, provenientes do Serviço de Radiologia de Intervenção do Hospital *St. Louis* em Lisboa, onde realizaram a embolização das artérias uterinas, seguidas pelo Prof^o Doutor João Pisco;
- uma população de mulheres com carcinoma do colo do útero, resultantes da infeção por HPV, provenientes do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil (IPOFG) e delegações de Lisboa, foram disponibilizadas pela Prof^a Doutora Maria Clara Bicho e as do Porto disponibilizadas pelo Prof^o Doutor Rui Medeiros;
- um grupo controlo, composto por mulheres previamente integradas em outros projetos do Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, compatíveis com os objetivos do estudo;

3.1.1 Caracterização das populações

Para a caracterização das populações, sempre que possível, procedeu-se à recolha de parâmetros clínicos pertinentes para o estudo.

Para o grupo de mulheres com carcinoma do colo do útero, registaram-se os seguintes dados: a idade, os hábitos tabágicos e o n^o de gravidezes.

No grupo constituído por mulheres com fibromiomas, registaram-se os seguintes dados: a idade, o n^o de gravidezes, o n^o de fibromiomas, os respetivos volumes (útero e fibromioma dominante) antes e após a realização da técnica EFU, a localização do fibromioma dominante e o grau de isquemia obtido. Os volumes do útero e do fibromioma dominante foram recolhidos com recurso a ecografia pélvica e ressonância magnética antes da EFU e, em média, 6 meses após o procedimento, multiplicando-se os 3 diâmetros por 0,523, por se tratar de um elipsoide.

Para a população controlo composta por mulheres aparentemente saudáveis, procedeu-se à criação de uma base de parâmetros comuns às dos grupos em estudo.

Todas as mulheres foram previamente identificadas através da atribuição de um código alfanumérico e as informações recolhidas correspondentes a cada uma encontram-se registadas numa base de dados confidencial. As amostras de sangue total periférico utilizadas foram obtidas mediante o consentimento informado de todas as mulheres envolvidas (**Anexo II**).

3.2 Metodologia

3.2.1 Colheita e tratamento das amostras biológicas

O sangue previamente recolhido, foi transferido para tubos de vidro de 10 ml, devidamente identificados e com um anticoagulante no interior, EDTA. As amostras utilizadas para genotipagem foram armazenadas a -20°C até à realização da extração de ADN.

3.2.2 Extração de ADN

O ADN genómico foi extraído a partir de sangue periférico total, colhido nas condições anteriormente descritas. Recorreu-se a um método de extração não enzimática de ADN de leucócitos obtidos diretamente de sangue periférico, que é um método de “*salting-out*” adaptado de Lahiri & Nurnberger (1991). O protocolo com os procedimentos detalhados encontra-se em anexo (**Anexo III – A; Anexo III - B**).

3.2.3 Quantificação de ADN

Utilizou-se um espectrofotómetro de espectro completo (NanoDrop® ND-2000) para quantificar o ADN extraído (ng/μL) e determinar a sua concentração e pureza – através da razão entre absorvências 260/280 e 230/260.

3.2.4 Amplificação e genotipagem do ADN

3.2.4.1 Polimorfismos da NOS2/iNOS (Intrão 16 – +88G>T, rs9282801; Exão 16 – +14C>T, rs229718)

Para a análise destes polimorfismos utilizamos a técnica de PCR-RFLP. Os *primers* utilizados, *forward* e *reverse*, respetivamente, foram 5'-TAAACCAACTTCCGTGGTGGG-3' e 5'-AGCTGGAGAATGGAGCTGGAC-3', para a amplificação de um fragmento de 455 bp.

Inicialmente, pipetamos 200 ng de ADN genómico para tubos de reação devidamente identificados ao qual se adicionou H₂O, quando necessário, até perfazer 10 μl. Depois, colocaram-se os tubos num termociclador a 94°C por um período de dois minutos, com o objetivo de se proceder à desnaturação do ADN – *hot start*.

Preparamos e adicionamos a cada tubo, a seguinte mistura reacional: 10 pmol de cada *primer*, 12,5 μl de DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (**Anexo III - C**) e 0,5 μl de H₂O, para um volume final de 25 μl.

Após estes passos, colocamos os tubos num termociclador, submetendo-os às seguintes condições de PCR: 35 ciclos de 45 segundos a 94°C (desnaturação), 45 segundos a 62,3°C (emparelhamento), 45 segundos a 72°C (extensão), acrescentando-se uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Analizamos 10 μl de produto de amplificação num gel de agarose 3% em 50 ml de tampão TAE 1X (obtido através da diluição 1/10 de TAE 10X, **Anexo III - C**), contendo 5 μl de brometo de etídio (10μg/ml), a 110V durante 90 minutos. A visualização dos géis obtidos num transiluminador de luz ultravioleta permitiu confirmar a sua amplificação.

Após a confirmação da amplificação, procedemos à digestão das amostras amplificadas com a endonuclease *Ade I* (Dra III) para o intrão 16 (rs9282801) e com a *Tas I* (Tsp 509 I) para o exão 16 (rs229718), durante 16 horas a 61°C e 37°C, respetivamente. A digestão consiste na preparação, em tubos de reação, da seguinte mistura reacional: 10 μl de produto de PCR, 2 μl de *Buffer R*⁺, 1 μl de enzima de digestão e 18 μl de H₂O.

Após a digestão, analisamos 10 μl de produto de reação num gel de agarose de 3%, feitos com 50 ml de TAE 1X e 5μl de brometo de etídio (10μg/ml) durante 1 hora a 110V, para o intrão

16 (rs9282801) e a 90 minutos a 110V para o extão 16 (rs2297518). A visualização dos géis obtidos num transiluminador permite a deteção e caracterização das amostras para o respetivo polimorfismo.

3.2.4.2 Polimorfismo da NOS3/eNOS (27bp-VNTR)

Para a análise deste polimorfismo recorremos à técnica de PCR. O par de *primers* utilizados foram, *forward* e *reverse* respetivamente, 5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3' e 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3', para a amplificação do ADN;

Inicialmente pipetamos 200 ng de ADN genómico para tubos de reação devidamente identificados e adicionou-se, quando necessário, H₂O até perfazer 10 µl. Depois colocaram-se os tubos num termociclador a 94°C, durante 2 minutos, para se proceder à desnaturação do ADN – *hot start*.

Preparamos e adicionamos a cada tubo, a seguinte mistura reacional: 10 pmol de cada *primer*, 12,5 µl DreamTaq Green PCR Master Mix 2x e 0,5 µl de H₂O, para um volume final de 25 µl.

Após estes passos, colocamos os tubos no termociclador, sendo submetidos ao seguinte programa de PCR (30 ciclos): 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 55°C (emparelhamento), 45 segundos a 72°C (extensão), com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Analisaram-se 10 µl de produto amplificado num gel de agarose a 3% em 50 ml de tampão TAE 1X com adição de 5 µl de brometo de etídio (10mg/ml) a 110V durante 120 minutos. Os géis foram visualizados num transiluminador de luz ultravioleta, permitindo a sua deteção e caracterização.

3.2.4.3 Polimorfismo C677T do MTHFR (rs1801133)

Para a análise deste polimorfismo utilizamos a técnica de PCR-RFLP. O par de *primers* utilizado, *forward* e *reverse* foi 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGC-3' e 5'-AGGACGGTGCAGTGAGAGTG-3', respetivamente, para a amplificação de um fragmento com 198 bp.

Inicialmente pipetamos 200 ng de ADN genómico para tubos de reação devidamente identificados e adicionou-se, quando necessário, H₂O até perfazer 10 µl. Depois, colocaram-se os tubos num termociclador a 94°C, durante 2 minutos, para se proceder à desnaturação do ADN – *hot start*.

Após estes passos, preparamos e adicionamos a cada tubo, a seguinte mistura reacional: 10 pmol de cada *primer*, 12,5 µl de DreamTaq Green PCR Master Mix 2x e 0,5 µl de H₂O, para um volume final de 25 µl.

Colocaram-se os tubos num termociclador, submetendo-os ao seguinte programa de PCR (30 ciclos): 2 minutos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 64°C (emparelhamento), 1 minuto a 72°C (extensão), acrescido de uma extensão final de 1 minuto a 72°C.

Analisaram-se 10 µl de produto de amplificação num gel de agarose a 2%, 50 ml de TAE 1X, com 5 µl de brometo de etídio (10 µg/ml), a 110V durante 30 minutos. A visualização dos géis obtidos num transiluminador de luz ultravioleta permitiu confirmar a sua amplificação.

Após confirmação, procedeu-se à digestão das amostras amplificadas com a enzima *Hinf* I, em tubos de reação com a seguinte mistura reacional: 15 µl de produto de PCR, 2 µl de *Buffer* R⁺, 0,5 µl de enzima e 2,5 µl de H₂O, para um volume final de 20 µl. Os tubos foram colocados no termociclador a 37°C durante 18 horas para efetuar a digestão.

Após a digestão, analisaram-se 10 µl de produto da digestão num gel de agarose a 3% em 50 ml de tampão TAE 1X, com 5 µl de brometo de etídio (10 µg/ml) a 110V durante 90 minutos. Visualizaram-se os géis de agarose num transiluminador de ultravioleta para caracterização das amostras.

Cada reação de PCR e posteriormente nas reações de hidrólise enzimática, continham um controlo negativo (H₂O). Para a confirmação do tamanho das bandas amplificadas e obtidas após digestão, utilizamos um marcador de peso molecular de forma a identificar corretamente o polimorfismo em estudo.

3.2.5 Análise Estatística

Foi construída uma base de dados na plataforma IBM SPSS 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), onde se efetuou a análise estatística com um nível de significância estabelecido de 5%.

Para as variáveis contínuas realizou-se o teste não-paramétrico *Kolmogorov-Smirnov*, para aferir sobre a distribuição normal das variáveis. Conforme o resultado, recorreu-se aos testes paramétricos e não paramétricos, caso as variáveis seguissem uma distribuição normais ou não, respetivamente. Quando pertinente, recorreu-se a análise de correlação de Spearman.

Para a avaliação das variantes, recorreu-se ao teste do Qui-quadrado (χ^2) de Pearson para verificar se todas as populações se encontravam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, tendo esta análise, como princípio, a distribuição alélica. As frequências observadas e esperadas pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foram verificadas.

Através da análise do qui-quadrado (χ^2) estudámos as diferenças genotípicas e alélicas, entre a população patológica e a população controlo, para ambas as patologias. Também através desta análise realizamos um estudo genótipo-fenótipo para aferir a influência dos polimorfismos estudados na modulação dos parâmetros clínicos dos fibromiomas.

Para aferir das diferenças entre os resultados obtidos antes e depois da técnica de embolização dos fibromiomas uterinos (EFU), relativamente aos volumes (em centímetros cúbicos: cc) uterinos e dos fibromiomas dominantes, recorreu-se a um teste não paramétrico, de *Wilcoxon*.

Recorreu-se também ao cálculo de *Odds Ratio* (OR), através de uma análise de regressão logística binária, para determinar o risco dos genótipos em ambas as patologias, com intervalo de confiança a 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das populações

4.1.1 População de mulheres com fibromiomas embolizados

Relativamente à caracterização da população composta por mulheres com fibromiomas, tratada por embolização das artérias uterinas, através da análise da **Tabela 4.1** podemos observar o número de mulheres caracterizadas e os parâmetros clínicos recolhidos: volumes do fibromioma e do útero antes e após a EFU, o número de fibromiomas e a percentagem de isquemia obtida.

Para as variáveis contínuas consideradas, procedeu-se a uma análise com recurso a um teste de *Kolmogorov-Smirnov*, para aferir a sua normalidade.

Nenhuma das características avaliadas seguia uma distribuição normal.

Para a idade, na população controlo, obtivemos uma mediana de 41 anos (18 e 85, mínimo e máximo, respetivamente) e na população de mulheres com fibromiomas, uma mediana de 39 anos (24 e 57, mínimo e máximo, respetivamente).

Através de um teste de *Mann-Whitney*, utilizado quando não se verifica uma distribuição normal, verificamos que existem diferenças significativas para a idade entre as 2 populações ($p=0,001$). Sendo a moda de 32 e 34 para a população controlo e população de mulheres com fibromiomas, respetivamente.

Tabela 4.1. Caracterização dos parâmetros clínicos da população de mulheres com fibromiomas

Parâmetro	N (Total)	Mediana [mín-máx]	Média (\pm DP)	P*
VFDP_{Pré}	159	69 [1-1176]		<0.001
VFDP_{Pós}	108	38,5 [1-1000]		
VUP_{Pré}	173	303 [59-1901]		<0.001
VUP_{Pós}	117	217 [29-1449]		
NF	155		3,6 \pm 1,7	
Isquemia	102	91 [0-100]		

N – Número de mulheres caracterizadas; NF – Número de fibromiomas; DP – Desvio padrão; VFDP_{Pré}/VFDP_{Pós} – Volume do fibromioma dominante antes e após o procedimento da EFU; VUP_{Pré}/VUP_{Pós} – Volume uterino antes e após o procedimento da embolização dos fibromiomas uterinos (EFU). P – p-value.

*nível de significância de 5%.

Para as 159 mulheres caracterizadas relativamente ao volume do fibromioma dominante obtivemos, antes da EFU, 69cc de mediana (1 e 1176cc, mínimo e máximo, respetivamente) e 38.5cc de mediana (1 e 1000cc, mínimo e máximo, respetivamente) após a EFU. Em relação ao volume uterino, antes da EFU, registamos 303 cc de mediana (59 e 1901cc, mínimo e máximo, respetivamente) e após a EFU, 217cc de mediana (29-1449cc, mínimo e máximo, respetivamente).

Para a redução do volume do fibromioma dominante, obtivemos 50% na mediana (sendo que, a redução mais acentuada foi de 286%, tendo ocorrido, no máximo, um aumento de 546%). Para o volume uterino, obtivemos uma redução de 34% na mediana (sendo a redução mais acentuada de 94,3%, tendo ocorrido, no máximo, um aumento de 84.6%).

Para os volumes do útero e do fibromioma dominante, de forma a perceber a existência de diferenças significativas entre os valores obtidos antes e os valores obtidos após a EFU, recorremos a um teste não paramétrico, *Wilcoxon*, para 2 amostras relacionadas, a um nível de significância de 5%, verificando-se a existência de diferenças significativas para ambos ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respetivamente).

Relativamente ao número de fibromiomas, para as 155 mulheres caracterizadas, obtivemos uma média de $3,6 \pm 1,7$ fibromiomas. A maioria das mulheres apresentava ≥ 5 fibromiomas (54,2%), sendo a restante distribuição: 1 (23,2%) e 2-4 (22,6%).

Para o grau de isquemia obtido após o procedimento, para as 102 mulheres caracterizadas, obtivemos uma mediana de 91% (0-100). Sendo que, a maioria obteve um grau de isquemia entre os 80-100% (90%).

Relativamente à localização do fibromioma dominante, para as 158 mulheres caracterizadas, verificou-se que a maioria eram fibromiomas intramurais (43,7%), seguindo-se os subserosos (36,7%) e submucosos (10,8%). Existindo por vezes, fibromiomas considerados intramurais/subserosos (4,4%) e intramurais/submucosos (4,4%).

Na **Tabela 4.2**, podemos observar o número de gravidezes por classes, para a população de mulheres com fibromiomas embolizados e população controlo.

Tabela 4.2. Classes de gravidezes para a população de mulheres com fibromiomas e população controlo

	Fibromiomas (N=159)	Controlos (N=152)	OR [IC, 95%]	p*
Gravidezes				
0 (%)	63 (39,6)	1 (0,7)	1,00 (Ref.)	–
1-2 (%)	75 (47,2)	133 (87,5)	0,009 [0,001-0,06]	<0,001
≥ 3 (%)	21 (13,2)	18 (11,8)	0,019 [0,002-0,15]	<0,001

OR – Odds Ratio, **IC** – Intervalo de confiança, **P** – p-value;

*nível de significância de 5%;

Em relação às gravidezes, para as 159 mulheres com fibromiomas caracterizadas, concluímos que, em média cada mulher teve $1,22 \pm 1,64$ gravidezes. Sendo que, 63 eram nulíparas (39,6%), 75 tiveram entre 1-2 gravidezes (47,2%) e 21 tiveram ≥ 3 gravidezes (13,2%). Na população controlo, para as 152 mulheres caracterizadas, obtivemos uma média de $1,74 \pm 0,76$ gravidezes. Sendo que, 1 era nulípara (0,7%), 133 tiveram entre 1-2 gravidezes (87,5%) e 18 tiveram ≥ 3 gravidezes (11,8%). Através de um teste *t-student* para amostras independentes, verificamos que existem diferenças significativas entre as populações, $p < 0,001$. Atendendo às classes consideradas, através de uma análise de regressão logística, obtivemos um OR (1-2) = 0,009 [0,0001-0,06], $p < 0,001$ e um OR (≥ 3) = 0,019 [0,0002-0,15], $p < 0,001$.

Na **tabela 4.3** podemos verificar os resultados de uma análise de correlação de Spearman entre os parâmetros apresentados, de forma a aferir se há relação entre eles.

Tabela 4.3 - Correlação de Spearman para os parâmetros clínicos da população de mulheres com fibromiomas

		RFD	RU	LFD	Isquemia	Idade	VU_Pré	VFD_Pré
RFD								
r		1,000	0,300**	-0,032	-0,112	0,040	0,080	0,137
p		–	0,003	0,753	0,302	0,700	0,431	0,173
RU								
r			1,000	0,014	-0,227*	-0,032	-0,226*	0,013
p			–	0,887	0,027	0,747	0,016	0,899
LFD								
r				1,000	-0,160	-0,038	-0,134	-0,102
p				–	0,117	0,640	0,097	0,215
Isquemia								
r					1,000	-0,026	0,046	-0,052
p					–	0,798	0,653	0,617
Idade								
r						1,000	0,107	0,029
p						–	0,172	0,725
VU_Pré								
r							1,000	0,711**
p							–	<0,001

RFD – Redução do fibromioma dominante; **RU** – Redução uterina; **LFD** – Localização do fibromioma dominante; **VU_Pré** – Volume uterino pré-embolização; **VFD_Pré** – Volume do fibromioma dominante pré-embolização;

** nível de significância de 1%

* nível de significância de 5%

Para esta análise verificamos que: há uma forte correlação direta entre o volume do fibromioma dominante (VFD) e o volume uterino (VU) ($r=0,711$, $p<0,001$); há uma correlação entre a redução observada do fibromioma dominante (RFD) e a redução uterina (RU) ($r=0,300$, $p=0,003$); há uma ligeira correlação inversa entre o volume uterino (VU) e a percentagem de redução uterina (RU) após o procedimento ($r= -0,226$, $p=0,016$). Para as restantes características não obtivemos correlações significativas.

4.1.2 População de mulheres com carcinoma do colo do útero

Relativamente à caracterização da população composta por mulheres com carcinoma do colo do útero e da população controlo, através da análise da **Tabela 4.4** podemos observar o número de mulheres caracterizadas para cada parâmetro clínico.

Procedeu-se a uma análise com recurso ao teste de *Kolmogorov-Smirnov*, para aferir a normalidade dos parâmetros.

Nenhuma dos parâmetros clínicos avaliados segue uma distribuição normal.

Para a idade, na população controlo, obtivemos 41 anos de mediana (18 e 88, a idade mínima e máxima, respetivamente) e na população composta por mulheres com carcinoma do colo do útero também obtivemos 41 anos de mediana (19 e 77, a idade mínima e máxima, respetivamente). Através de um teste não paramétrico, *Mann-Whitney*, verificamos que não existem diferenças significativas para a idade entre as 2 populações consideradas ($p=0,938$).

Tabela 4.4. Caracterização dos parâmetros obtidos da população mulheres com carcinoma do colo do útero e população controlo

Parâmetros								
Hábitos Tabágicos	Controlo (N=291)	CCU (N=97)	P*	Nº gravidezes	Controlo (N=152)	CCU (N=151)	P*	
Sim (%)	16 (5,5)	24 (24,7)	<0,001	0 (%)	1 (0,6)	18 (11,9)	<0,001	
Não (%)	275 (94,5)	73 (75,3)		1-2 (%)	133 (87,5)	58 (38,4)		
				≥3 (%)	18 (11,9)	75 (49,7)		

OR – Odds Ratio, CCU – Carcinoma do colo do útero. P – p-value;

* significância de 5%.

Para os hábitos tabágicos, para as 291 mulheres caracterizadas da população controlo, verificamos que 16 mulheres são fumadoras e 275 não fumadoras. Na população de mulheres com carcinoma do colo do útero, das 97 caracterizadas, verificamos que 24 são fumadoras e 73 não fumadoras.

Verificamos que, entre a população controlo e a população de mulheres com carcinoma do colo do útero, existem diferenças significativas para os hábitos tabágicos ($p < 0,001$), 24,7% das mulheres com carcinoma do colo do útero fumam enquanto que, apenas 5,5% das mulheres da população controlo possuem hábitos tabágicos. Através de uma análise de regressão logística binária (Tabela 4.5), para as mulheres consideradas, as fumadoras têm um risco 5,7 [2,9-11,2] superior de desenvolver cancro do colo do útero ($p < 0,001$).

Em relação às gravidezes, para 151 mulheres caracterizadas da população de mulheres com carcinoma do colo do útero, verificamos uma média de 2,89 gravidezes. Sendo que, 18 eram nulíparas, 58 tiveram entre 1-2 gravidezes e 75 tiveram ≥ 3 gravidezes. Na população controlo, para as 152 mulheres caracterizadas, verificamos uma média de $1,74 \pm 0,76$ gravidezes, 1 é nulípara, 133 com 1-2 gravidezes e 18 mulheres com ≥ 3 gravidezes. Para as gravidezes também se notaram diferenças significativas ($p < 0,001$) na distribuição das classes (Tabela 4.5), procedendo-se ao cálculo de Odds Ratio. Tendo como referência a classe das mulheres nulíparas, obtivemos, para um número de gravidezes (1-2), um OR (1-2) = 0,024 [0,003-0,186], $p < 0,001$ e, acima de 3 gravidezes, um OR (≥ 3) = 0,23 [0,03-1,85], $p = 0,168$.

Tabela 4.5 Odds Ratio associados às classes de gravidezes e hábitos tabágicos para a população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controlo

Classes Gravidez	Controlo (N=152)	CCU (N=151)	OR [IC, 95%]	P*
0 (%)	1 (0,6)	18 (11,9)	1,00 (Ref)	–
1-2 (%)	133 (87,5)	58 (38,4)	0,024 [0,003-0,186]	<0,001
≥3 (%)	18 (11,9)	75 (49,7)	0,23 [0,03-1,85]	0,168
Hábitos Tabágicos	(N=291)	(N=97)		
Sim	16 (5,5)	24 (24,7)	5,7 [2,86-11,2]	<0,001
Não	275 (94,5)	73 (75,3)	1,00 (Ref)	–

CCU – Carcinoma do colo do útero; N – Número de mulheres caracterizadas OR – Odds Ratio, IC – Intervalo de confiança, P – p-value;

*nível de significância de 5%.

4.2 Análise dos polimorfismos da Sintase do NO induzível (NOS2/iNOS)

4.2.1 Polimorfismo no Intrão 16 (+88G>T) (rs9282801) nos fibromiomas embolizados

Para este polimorfismo obtivemos, com sucesso, o genótipo de 68 mulheres com fibromiomas e de 25 mulheres da população controlo. Todos os resultados foram obtidos considerando o ajuste para a idade.

Na identificação deste polimorfismo (**Figura Suplementar 8.3 do Anexo IV – A**), encontramos, em ambas as populações, os 3 genótipos possíveis: GG, homozigótico sem mutação, caracterizado por 1 banda com 455 bp; GT, heterozigótico, caracterizado por 3 bandas com 455, 263 e 192 bp; e, o TT, homozigótico com mutação, caracterizado por 2 bandas com 263 e 192 bp.

Para averiguar se as populações se encontravam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) procedeu-se a uma análise do χ^2 de Pearson entre valores esperados e observados. Ambas as populações respeitam o HWE ($\chi^2 = 0,979$, $p = 0,3225$, na população controlo; $\chi^2 = 1,893$; $p = 0,1689$, na população dos fibromiomas).

Devido ao reduzido número de genótipos obtidos, testou-se o agrupamento de um genótipo homozigótico com o heterozigótico, segundo os modelos recessivo e dominante, procurando aumentar o poder estatístico dos testes. Dos 3 modelos testados, GG vs. GT vs. TT ($\chi^2 = 4,251$, $p = 0,119$), GT+GG vs. TT ($\chi^2 = 2,380$, $p = 0,123$) e GT+TT vs. GG ($\chi^2 = 3,515$, $p = 0,061$), o último revelou resultados mais próximos da significância.

Na **tabela 4.6**, podemos observar a distribuição genotípica da população de mulheres com fibromiomas e da população controlo, bem como os *Odds Ratios* calculados para cada genótipo, de forma a aferir qualquer associação entre eles e uma eventual ação de proteção/suscetibilidade no desenvolvimento de fibromiomas. Para a análise da frequência alélica, também na **tabela 4.6**, verificamos que existem diferenças significativas na sua distribuição entre as duas populações ($\chi^2 = 3,515$, $p = 0,024$).

Na população de mulheres com fibromiomas, obtivemos para os genótipos GG e GT+TT as frequências de 69,1% e 30,9%, respetivamente. Relativamente à população controlo, para os mesmos genótipos (GG e GT+TT), obtivemos as frequências de 48% e 52%, respetivamente.

Tabela 4.6 – Distribuição genotípica, frequências alélicas e *Odds ratio* do polimorfismo NOS2-Intrão16 na população de mulheres com fibromiomas e população controlo

Genótipos	Fibromiomas (N = 68)	Controlos (N=25)	P	OR [IC, 95%]	P ^a
GG (%)	47 (69,1)	12 (48)	0,119	1,00 (Ref)	–
GT (%)	17 (25)	9 (36)			
TT (%)	4 (5,9)	4 (16)			
GT+TT (%)	21 (30,9)	13 (52)	0,061	0,41 [0,16-1,01]	0,065
Frequência Alélica					
G (%)	111 (82)	33 (66)	0,024	1,00 (Ref)	–
T (%)	25 (18)	17 (34)		0,44 [0,21-0,91]	0,026

OR – *Odds Ratio*; IC – Intervalo de confiança, P – p-value;

* nível de significância de 5%; ^a ajustado para a idade;

Através de uma regressão logística, considerando o genótipo GG (selvagem) como referência, obtivemos um OR (GT+TT) = 0,41 [0,16-1,01], sugerindo um fator de proteção associado, mas que, devido ao intervalo de confiança e, subsequentemente, ao grau de significância não nos é permitido retirar conclusões ($p=0,065$).

Apesar dos resultados, na distribuição alélica verificamos uma diferença na sua distribuição, surgindo a presença do polimorfismo, com o alelo T associado a um efeito protetor no desenvolvimento da patologia, uma vez que, o OR (T) = 0,44 [0,21-0,91] é significativo. Ambos os intervalos de confiança e o grau de significância permitem apoiar as conclusões retiradas ($p=0,026$).

Para este polimorfismo não foi possível, em tempo útil, ultrapassar os problemas técnicos relacionados com a população composta por mulheres com carcinomas do colo do útero.

4.2.2 Polimorfismo no Exão 16 (+14C>T) da iNOS/NOS2 (rs2297518) nos fibromiomas embolizados

Para este polimorfismo obtivemos, com sucesso, os genótipos de 63 mulheres com fibromiomas e 25 de mulheres da população controlo. Todos os resultados foram obtidos considerando o ajuste para a idade.

Na identificação deste polimorfismo (**Figura Suplementar 8.4 do Anexo IV – B**), encontramos, em ambas as populações em estudo, os 3 genótipos possíveis: CC, homozigótico sem mutação, caracterizado por 2 bandas com 285 e 170 bp; CT, heterozigótico, caracterizado por 4 bandas com 285, 170 e 137 e 33 bp; e, o TT, homozigótico com mutação, caracterizado por 3 bandas com 285, 137 e 33 bp.

Para averiguar se as populações se encontravam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* procedeu-se a uma análise do χ^2 de Pearson entre valores esperados e observados. A população controlo encontra-se em HWE ($\chi^2=1,47$, $p=0,23$), enquanto que na população dos fibromiomas o HWE não se assume ($\chi^2= 5,67$; $p=0,02$).

Dos 3 modelos testados, CC vs. CT vs. TT ($\chi^2=2,586$, $p=0,274$), TT vs. CT+CC ($\chi^2=0,469$, $p=0,493$) e CC vs. CT + TT ($\chi^2=2,586$, $p=0,108$), o último deu resultados mais próximos da significância.

Na **tabela 4.7**, podemos observar a distribuição genotípica na população de mulheres com fibromiomas embolizados e da população controlo, bem como os *Odds Ratios* calculados para cada genótipo, de forma a aferir qualquer associação entre eles e uma eventual ação de proteção/suscetibilidade no desenvolvimento de fibromiomas. Para a análise das frequências alélicas, também na **tabela 4.7**, verificamos que não existem diferenças significativas na sua distribuição entre as duas populações ($\chi^2 = 2,952$, $p=0,086$).

Na população de mulheres com fibromiomas, obtivemos para os genótipos CC e CT+TT as frequências de 92,1% e 7,9%, respetivamente. Relativamente à população controlo, para os mesmos genótipos (CC e CT+TT), obtivemos as frequências de 80% e 20%, respetivamente.

Tabela 4.7 Distribuição genotípica, frequências alélicas e *Odds ratio* do polimorfismo NOS2-Exão16 na população de mulheres com fibromiomas e população controle

Genótipos	Fibromiomas (N =63)	Controlos (N=25)	P	OR ^a [IC, 95%]	P ^{*,a}
CC (%)	58 (92,1)	20 (80)	0,274	1,00 (Ref)	–
CT (%)	4 (6,3)	4 (16)			
TT (%)	1 (1,6)	1 (4)			
CT+TT (%)	5 (7,9)	5 (20)	0,108	0,33 [0,09-1,3]	0,113
Frequência Alélica					
C (%)	120 (95,2)	44 (88)	0,086	1,00 (Ref)	
T (%)	6 (4,8)	6 (12)		0,39 [0,12-1,3]	0,115

OR – *Odds Ratio*, IC – Intervalo de confiança, P – p-value;

* nível de significância de 5%, ^a ajustado para a idade;

Como já referido, entre a população controle e a população dos fibromiomas, após recurso ao teste estatístico do χ^2 ($\chi^2 = 2,586$, $p=0,108$) não encontramos diferenças significativas entre elas. Como não obtivemos diferenças significativas na distribuição genotípica e alélica, nenhum dos resultados deve ser considerado, sendo o OR (CT+TT) = 0,33 [0,09-1,3], $p=0,113$ e o OR (T) = 0,39 [0,12-1,3], $p=0,115$, não significativos, como sugere o intervalo de confiança obtido e o respetivo valor de significância.

Para este polimorfismo também não foi possível, em tempo útil, ultrapassar os problemas relacionados com a técnica para as amostras da população composta por mulheres com carcinoma do colo do útero.

4.3 Análise do polimorfismo da Sintase do NO constitutiva (NOS3/eNOS)

4.3.1 Polimorfismo do Intrão 4a/b (27bp-VNTR) nos fibromiomas embolizados

Para este polimorfismo obtivemos, com sucesso, 117 genótipos de mulheres com fibromiomas e 80 da população controle. Todos os resultados foram obtidos considerando o ajuste para a idade.

Na identificação deste polimorfismo (**Figura Suplementar 8.5 do Anexo IV – C**), encontramos, em ambas as populações em estudo, os 3 genótipos possíveis: 4b4b, homozigótico sem mutação, caracterizado por 1 banda com 420 bp; 4b4a, heterozigótico, caracterizado por 2 bandas com 420, 393 bp; e, o 4a4a, homozigótico com mutação, caracterizado por 1 banda com 393 bp.

Procedeu-se a uma análise do χ^2 de Pearson entre valores esperados e observados para as populações. A população controle, não se encontra em HWE ($\chi^2 = 8,800$, $p= 0,003$), enquanto que a população dos fibromiomas ($\chi^2 = 0,0575$, $p= 0,810$) respeita o equilíbrio HWE.

Dos 3 modelos testados nos fibromiomas, 4b4b vs. 4b4a vs. 4a4a ($\chi^2=5,191$, $p=0,075$), 4b4b vs. 4b4a+4a4a ($\chi^2=3,180$, $p=0,075$) e 4a4a vs. 4b4b+4b4a ($\chi^2=0,467$, $p=0,494$), os últimos 2 modelos deram resultados mais próximos da significância.

Na **tabela 4.8**, podemos observar a distribuição genotípica e frequência alélica da população de fibromiomas e da população controle. Para a análise da frequência alélica, também

na **tabela 4.8**, verificamos que não existem diferenças significativas na sua distribuição entre a população controle e a população de mulheres com fibromiomas ($\chi^2 = 1,449$, $p=0,229$).

Na população de mulheres com fibromiomas, obtivemos para os genótipos 4b4b e 4b4a+4a4a as frequências de 61,5% e 38,5%, respectivamente. Relativamente à população controle, para os mesmos genótipos (4b4b e 4b4a+4a4a), obtivemos as frequências de 73,8% e 26,2%, respectivamente.

Tabela 4.8 Distribuição genotípica, frequências alélicas e *Odds Ratio* do polimorfismo NOS3-Intrão4a/b na população de mulheres com fibromiomas e população controle

Genótipos	Fibromiomas (N=117)	Controlos (N=80)	P	OR [IC, 95%]	P ^{*,a}
4b4b (%)	72 (61,5)	59 (73,8)	0,075	1,00 (Ref)	–
4b4a (%)	39 (33,4)	15 (18,7)			
4a4a (%)	6 (5,1)	6 (7,5)			
4b4a + 4a4a (%)	45 (38,5)	21 (26,2)	0,075	1,4 [0,77-2,75]	0,253
Frequência Alélica					
b (%)	183 (78)	133 (83)	0,229	1,00 (Ref)	–
a (%)	51 (22)	27 (17)		1,2 [0,68-1,95]	0,604

OR – *Odds Ratio*, IC – Intervalo de confiança, P – p-value;

*nível de significância de 5%, ^a ajustado para a idade;

Entre a população controle e a população de mulheres com fibromiomas, após recurso ao teste estatístico do χ^2 ($\chi^2 = 5,191$, $p=0,075$) não encontramos diferenças significativas entre elas, ainda que se possa assumir uma ligeira tendência.

Como não obtivemos diferenças significativas na distribuição genotípica e alélica, os OR obtidos, OR (4b4a+4a4a) = 1,4 [0,77-2,75], $p=0,253$ e OR (a) = 1,2 [0,68-1,95], $p=0,604$, não devem ser considerados, uma vez que não representam qualquer significância estatística.

4.3.2 Polimorfismo do Intrão 4a/b (27bp-VNTR) no Carcinoma do colo do útero

Para este polimorfismo obtivemos, com sucesso, 93 genótipos de mulheres da população com carcinoma do colo do útero e 80 da população controle (**Figura Suplementar 8.5 do Anexo IV - C**).

Para esta análise também se identificaram, em ambas as populações em estudo, os 3 genótipos possíveis referidos anteriormente.

Procedeu-se a uma análise do χ^2 de Pearson entre valores esperados e observados para as populações. A população controle, não se encontra em HWE ($\chi^2 = 8,800$, $p= 0,003$), enquanto que a população do carcinoma do colo do útero ($\chi^2 = 0,0896$, $p= 0,764$) respeita o modelo.

Dos 3 modelos testados no carcinoma do colo do útero, 4b4b vs. 4b4a vs. 4a4a ($\chi^2 = 4,625$, $p= 0,099$), 4a4a vs 4b4b+4b4a ($\chi^2 = 4,572$, $p= 0,032$) e 4b4b vs 4b4a + 4a4a ($\chi^2 = 0,315$, $p= 0,575$), optamos por utilizar o modelo mais significativo para a análise estatística.

Na **Tabela 4.9**, observamos as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo para a população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controle.

Na população de mulheres com carcinoma do colo do útero, obtivemos para os genótipos 4b4b+4b4a e 4a4a as frequências de 98,9% e 1,1%, respetivamente. Relativamente à população controlo, para os mesmos genótipos (4b4b+4b4a e 4a4a), obtivemos as frequências de 92,5% e 7,5%, respetivamente.

Tabela 4.9 Distribuição genotípica, frequências alélicas e *Odds Ratio* do polimorfismo Intrão4a/b-NOS3 na de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controlo

Genótipos	CCU (N=93)	Controlo (N=80)	P*	OR [IC, 95%]	p*
4b4b (%)	72 (77,4)	59 (73,7)	0,099		
4b4a (%)	20 (21,5)	15 (18,8)			
4a4a (%)	1 (1,1)	6 (7,5)		1,00 (Ref)	–
4b4b + 4b4a (%)	92 (98,9)	74 (92,5)	0,032	7,5 [0,88-63]	0,066
Frequência Alélica					
b (%)	164 (88)	133 (83)	0,99	0,73 [0,43-1,22]	0,230
a (%)	22 (12)	27 (17)		1,00 (Ref.)	

CCU – Carcinoma do colo do útero, OR – *Odds Ratio*, IC – Intervalo de confiança, P – p-value;

*nível de significância de 5%.

Entre a população controlo e a população do carcinoma do colo do útero, através de um teste do χ^2 de Pearson, encontramos diferenças significativas ($\chi^2 = 4,572$, $p = 0,032$) na distribuição genotípica.

Para a população de mulheres com carcinoma do colo do útero, após o ajuste pela idade, obtivemos um OR (4b4b+4b4a) = 7,5 [0,88-63], $p = 0,066$, resultado que permite assumir uma ligeira tendência estatística, apesar de não obtermos um intervalo de confiança e valores de *p-value* ($p = 0,066$) significativos. Também para a análise da frequência alélica entre as 2 populações, não se verificamos diferenças na distribuição alélica ($p = 0,99$).

4.4 Análise do polimorfismo (C677T) da Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)

4.4.1 MTHFR (C677T) (rs180113) nos fibromiomas embolizados

Para este polimorfismo obtivemos, com sucesso, 120 genótipos da população de mulheres com fibromiomas e 457 da população controlo.

Na identificação deste polimorfismo (**Figura Suplementar 8.6 do Anexo IV**), encontramos, em ambas as populações em estudo, os 3 genótipos possíveis: CC, homozigótico sem mutação, caracterizado por 1 banda com 198 bp; CT, heterozigótico, caracterizado por 2 bandas com 198 e 175 bp; e, o TT, homozigótico com mutação, caracterizado por 1 banda com 175 bp.

Para averiguar se as populações se encontravam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* procedeu-se a uma análise do χ^2 de Pearson entre valores esperados e observados. As populações utilizadas encontram-se em HWE ($\chi^2 = 0,0005$, $p = 0,981$, na população controlo; $\chi^2 = 1,893$; $p = 0,1689$, na população dos fibromiomas).

Para os 3 modelos considerados para a população de mulheres com fibromiomas, CC vs. CT vs. TT ($\chi^2 = 14,848$, $p = 0,001$), CC+CT vs. TT ($\chi^2 = 2,072$, $p = 0,150$) e CC vs. CT+TT

($\chi^2=14,660$, $p= <0,001$), optamos por utilizar o último, uma vez que, é o que representa um resultado mais próximo da significância.

Na **Tabela 4.10**, observamos as frequências genótípicas na população de mulheres com fibromiomas e na população controlo, bem como os valores de p obtidos através de uma análise χ^2 de *Pearson*, de forma a verificar se existem diferenças significativas entre as populações ao nível da distribuição genotípica.

Na população de mulheres com fibromiomas, obtivemos para os genótipos CC e CT+TT as frequências de 64,2% e 35,8%, respetivamente. Relativamente à população controlo, para os mesmos genótipos (CC e CT+TT), obtivemos as frequências de 44,4% e 55,6%, respetivamente.

Tabela 4.10 Distribuição genotípica, frequências alélicas e *Odds Ratio* do polimorfismo C677T do gene MTHFR na população de mulheres com fibromiomas e população controlo

Genótipos	Fibromiomas (N=120)	Controlos (N=459)	<i>P</i> *	OR [IC, 95%]	<i>P</i> *
CC (%)	77 (64,2)	204 (44,4)	<0,001	1,00 (Ref)	–
CT (%)	35 (29,2)	204 (44,4)			
TT (%)	8 (6,7)	51 (11,2)			
CT + TT (%)	43 (35,8)	255 (55,6)	<0,001	0,45 [0,29-0,69]	<0,001
Frequência Alélica					
C (%)	189 (79)	612 (67)	<0,001	1,00 (Ref)	–
T (%)	51 (21)	306 (33)		0,54 [0,39-0,77]	<0,001

OR – *Odds Ratio*, IC – Intervalo de confiança, *P* – p -value;

* nível de significância de 5%

Entre a população de mulheres com fibromiomas e a população controlo, após recurso ao teste estatístico do χ^2 de *Pearson* ($\chi^2 = 14,660$, $p= <0,001$) verificamos que existem diferenças significativas entre elas. Para a população de mulheres com fibromiomas, tendo o genótipo CC como referência, obtivemos um OR (CT+TT) = 0,45 [0,29-0,69], $p= <0,001$, sendo que, pela análise do intervalo de confiança e respetivo valor de p , verificamos que, para o desenvolvimento de fibromiomas, CT+TT poderá ter um efeito protetor. Também para a frequência alélica detetamos diferenças significativas ($p= <0,001$), algo também verificado para o OR (T)= 0,54 [0,39-0,77], $p= <0,001$, assumindo-se um potencial papel de proteção.

Tendo em conta que, como já referido, a distribuição deste polimorfismo é heterogénea entre etnias e sabendo que, a maioria das mulheres que compõem a população de mulheres com fibromiomas são de etnia africana (ou descendentes), foi obtida uma população controlo de origem africana, na plataforma *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) e realizada uma nova análise, de forma a perceber se o facto de termos uma população controlo maioritariamente caucasiana poderá ter influência na análise estatística da distribuição genotípica e alélica (**Tabela 4.11**).

Para averiguar se a população controlo, obtida através da plataforma, se encontrava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* procedeu-se a uma análise do χ^2 de *Pearson* entre valores esperados e observados. A população encontra-se em equilíbrio de HWE ($\chi^2= 0,61$, $p= 0,435$)

Tabela 4.11 Distribuição genotípica, frequências alélicas e *Odds Ratio* do polimorfismo C667T do gene MTHFR na de mulheres com fibromiomas e população controlo africana

Genótipos	Fibromiomas (N=120)	Controlos (N=661)	P	OR [IC, 95%]	p*
CC (%)	77 (64,1)	549 (83,1)	0,001	1,00 (Ref)	–
CT (%)	35 (29,2)	105 (15,8)			
TT (%)	8 (6,7)	7 (1,1)			
CT + TT (%)	43 (35,8)	112 (16,9)		2,04 [1,4-3,1]	0,001
Frequência Alélica					
C (%)	189 (79)	1203 (91)	<0,001	1,00 (Ref)	<0,001
T (%)	51 (21)	119 (9)		2,7 [1,9-3,9]	

OR – *Odds Ratio*, IC – Intervalos de confiança, P – p-value;

*nível de significância de 5%

Nesta análise estatística, a distribuição entre a população de mulheres com fibromiomas e a obtida para controlo de origem africana, também se verificam diferenças significativas (χ^2 : 31,144, $p < 0,001$), mas com resultados contraditórios face aos obtidos anteriormente.

Para a população de mulheres com fibromiomas, tendo o genótipo CC (selvagem) como referência, obtivemos um OR (CT+TT) = 2,04 [1,4-3,1], $p = 0,001$, sendo que, o intervalo de confiança e respetivo *p-value* apoiam o significado estatístico, relacionando o polimorfismo com o desenvolvimento de fibromiomas. Para a frequência alélica, considerando como referência o alelo C, obtivemos um OR (T) = 2,7 [1,9-3,9], $p < 0,001$, sugerindo o alelo T como fator de suscetibilidade.

Estes valores são discordantes com os obtidos anteriormente e isto pode dever-se à distribuição heterogénea da mutação entre etnias, referida anteriormente, carecendo de mais investigação.

4.4.2 – Polimorfismo (C667T) da Metilenotetrahidrofolato redutase (rs1801133) no Carcinoma do colo do útero

Para este polimorfismo foram obtidos com sucesso, 117 genótipos da população de mulheres com carcinoma do colo do útero e 457 da população controlo. Para esta análise também se identificaram, para este polimorfismo (**Figura Suplementar 8.5 do Anexo IV - D**), em ambas as populações em estudo, os 3 genótipos possíveis referidos anteriormente.

Para verificar se as populações se encontram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* procedeu-se a uma análise do χ^2 de Pearson entre valores esperados e observados. Ambas as populações se encontram em equilíbrio de HWE, controlo e mulheres com carcinoma do colo do útero ($\chi^2 = 3,96$, $p = 1,00$) e ($\chi^2 = 0,078$; $p = 0,779$), respetivamente.

Para os 3 modelos considerados para a população de mulheres com carcinoma do colo do útero, CC vs. CT vs. TT ($\chi^2 = 0,078$, $p = 0,962$), CC+CT vs. TT ($\chi^2 = 0,285$, $p = 0,593$) e CC vs. CT+TT ($\chi^2 = 0,000$, $p = 1,000$).

Na **Tabela 4.12**, observamos as frequências genotípicas do genótipo na população de mulheres com carcinoma do colo do útero, na população controlo e os valores de *p-value* obtidos através de uma análise χ^2 de *Pearson*, para verificar se existem diferenças significativas entre estas ao nível da distribuição genotípica.

Na população de mulheres com carcinoma do colo do útero, obtivemos, para os genótipos CC+CT e TT as frequências de 90% e 10%, respectivamente. Relativamente à população controlo, para os mesmos genótipos (CC+CT e TT), obtivemos as frequências de 89,7% e 10,3%, respectivamente.

Tabela 4.12 Distribuição genotípica, frequências alélicas e *Odds Ratio* do polimorfismo C667T do gene MTHFR na população de mulheres com carcinoma do colo do útero e população controlo

Genótipos	CCU (N=117)	Controlos (N=459)	P	OR [IC, 95%]	p*
CC (%)	52 (44,4)	204 (44,4)	0,962		
CT (%)	53 (45,3)	204 (44,4)			
TT (%)	12 (10,3)	51 (11,2)		0,8 [0,33-1,8]	0,594
CC + CT (%)	70 (89,7)	407 (88,8)	0,593	1,00 (Ref)	–
Frequência Alélica					
C (%)	157 (67)	612 (67)	0,901	1,00 [Ref]	
T (%)	77 (33)	306 (33)		1,01 [0,8-1,4]	0,901

CCU – Carcinoma do colo do útero, OR – *Odds Ratio*, IC – Intervalos de confiança, P – p-value;

* nível de significância de 5%

Entre a população controlo e a população de carcinomas, após recurso ao teste estatístico do χ^2 ($\chi^2 = 0,285$, $p=0,593$) não encontramos diferenças significativas entre elas. Também para a frequência alélica não obtivemos resultados significativos.

4.5 Análise estatística da relação entre os parâmetros clínicos e os genéticos para a população de mulheres com fibromiomas embolizados

A potencial influência dos polimorfismos estudados na modulação dos parâmetros clínicos obtidos foi testada através do teste do qui-quadrado. Através da análise da **Tabela Suplementar 8.1** e da **Tabela Suplementar 8.2 (Anexo IV)** podemos verificar a distribuição dos parâmetros clínicos pelos genótipos obtidos nos polimorfismos considerados nos genes relacionados com a sintase de óxido nítrico considerados (iNOS/NOS2 e eNOS/NOS3) e do metabolismo do folato (MTHFR), respectivamente.

Quando consideramos a localização do fibromioma dominante, obtivemos diferenças significativas na distribuição genotípica do polimorfismo presente no intrão 16 (+14C>T) da iNOS/NOS2 ($p<0,001$).

Também para o número de fibromiomas observados, obtivemos uma tendência para a diferença na distribuição do polimorfismo presente na MTHFR.

5. DISCUSSÃO

5.1 Discussão dos resultados da população de mulheres com fibromiomas

Os fibromiomas apesar de terem uma etiologia pouco clara e na sua larga maioria se apresentarem assintomáticos, representam o tumor ginecológico benigno mais comum entre as mulheres. A sua elevada morbilidade e os custos económicos associados, suportam a importância da investigação que envolvem os seus mecanismos moleculares e de desenvolvimento.

Com o avançar da investigação e do conhecimento obtido é esperado que ocorra uma redução dos efeitos negativos dos fibromiomas na morbilidade das mulheres, aumente o número de opções a nível de tratamentos e ocorra uma diminuição do número de histerectomias, levando, consequentemente, a menores gastos públicos em despesas hospitalares e a menores períodos de internamento (Hirst *et al.* 2008).

A variedade de tratamentos disponíveis tem aumentado nas últimas décadas e com o surgimento destas novas técnicas, para além das clássicas, miomectomia e histerectomia, surge a necessidade de se comprovar a sua eficiência e segurança. Neste trabalho, a população de fibromiomas considerada provém de mulheres que se sujeitaram à técnica de embolização dos fibromiomas uterinos, sendo possível, não só ter uma abordagem genética dos polimorfismos considerados no desenvolvimento de fibromiomas, como também, analisar a eficácia do tratamento de acordo com os parâmetros clínicos disponíveis.

A mediana de idades na população de fibromiomas situou-se nos 39 anos, o que está de acordo com o reportado em vários estudos, sendo os fibromiomas mais comuns em idade reprodutiva, maioritariamente na 4ª década de vida (Burn *et al.* 1999; Firouznia *et al.* 2007; Pisco *et al.* 2010; Kulkarni *et al.* 2016). A diferença entre idades nas duas populações consideradas ($p=0,001$), deve-se provavelmente ao facto de termos uma população controlo composta, também, por mulheres que se encontram na menopausa, sendo as mulheres da população patológica essencialmente representada por mulheres em idade reprodutiva.

Em média, cada mulher possuía $3,6 \pm 1,7$ fibromiomas, sendo que, a maioria tinha ≥ 5 (54%). Pelage *et al.* (2000) referiu, que a maioria das mulheres apresenta fibromiomas múltiplos (69%). Pron *et al.* (2003) referiu que a maioria das mulheres têm entre 2 a 4 fibromiomas. Também Davis *et al.* (2009) e Spies *et al.* (2005) obtiveram resultados concordantes com os obtidos neste trabalho.

Relativamente à localização do fibromioma considerado dominante, a grande maioria representa fibromiomas intramurais (43,7%), seguindo-se os subserosos (36,7%) e submucosos (10,8%). Existindo por vezes, fibromiomas considerados intramural/subserosos (4,4%) e intramural/submucoso (4,4%). Estes resultados vão de encontro ao referido noutros trabalhos, onde se concluiu que os leiomiomas mais comuns são os intramurais (Pelage *et al.* 2000; Pron *et al.* 2003; Sulaiman *et al.*, 2003; Spies *et al.* 2005; Froeling *et al.* 2013; Kulkarni *et al.* 2016). Estes resultados também podem ser influenciados pelo facto dos fibromiomas intramurais possuírem uma taxa de crescimento superior aos fibromiomas de outras localizações, o que poderá conduzir a um maior desenvolvimento de sintomas e consequente deteção (Mavrelou *et al.* 2010).

As variações no volume uterino e do fibromioma dominante, depois do recurso à embolização das artérias uterinas, a par do grau de isquemia obtido e do alívio sintomático resultante, representam ferramentas úteis na avaliação do sucesso da técnica (Pisco *et al.* 2011). Neste trabalho verificamos que existem diferenças significativas entre os valores obtidos previamente e os valores obtidos após o tratamento, com uma média de 6 meses de intervalo.

Em relação ao volume uterino, como já referido, pode variar ao longo da vida, de acordo com as funções que desempenha e/ou devido a alterações patológicas (Kelsey *et al.* 2016), como por exemplo, a presença de fibromiomas. Nas mulheres caracterizadas obtivemos uma mediana de 303cc, que vai de encontro às alterações de volumes resultantes do desenvolvimento de fibromiomas (Spies *et al.* 2001). A redução de 34% na mediana do volume uterino, resultando em diferenças significativas ($p < 0,001$), vai de encontro ao referido em vários trabalhos. Pron *et al.* (2003), referiu uma redução média de 35% e Sena-Martins *et al.* (2003), ao fim de 12 semanas (3 meses), referiu uma redução média de 56,3%. Também McLucas *et al.* (2001), referiu uma redução de 42% no volume uterino ao fim de 6 meses, valor ligeiramente diferente do obtido (34%).

O volume do fibromioma dominante antes do procedimento era de 69 cc de mediana, enquanto que após o procedimento, essa mediana sofreu uma redução de 50%, passando para 38.5cc ($p < 0,001$). Em estudos com o mesmo tempo de *follow-up*, como o de McLucas *et al.* (2001), Sipola *et al.* (2010), Hirst *et al.* (2008) e Burn *et al.* (2000), referiram uma redução do volume do fibromioma dominante de 31%, 44%, 47,3% e 59%, respetivamente.

As reduções observadas, devem-se ao bloqueio do suplemento sanguíneo com recurso a agentes embólicos, que, conduzindo a um ambiente isquémico (mediana= 91%) leva à redução dos fibromiomas e consequentemente, do útero. Os resultados são concordantes com estudos semelhantes realizados anteriormente (Goodwin *et al.* 1997; Spies *et al.* 2005; Pisco *et al.* 2010).

Apesar do sucesso obtido, parte importante da eficácia deve-se à manutenção dos resultados a médio e a longo prazo. Neste estudo, não conseguimos obter informações sobre a situação das mulheres para além dos 6 meses após o procedimento. Estudos com *follow-up* após um ano, revelaram uma redução de 50-70% relativamente ao volume do leiomioma dominante, com o volume uterino a acompanhar a redução (McLucas *et al.* 2001; Watson e Walker e Pelage, 2002; Ravina *et al.* 2003). Van der Kooij *et al.* (2010), referiu que após 5 anos, 28,4% das mulheres submetidas a embolização necessitou de histerectomia, Manyonda *et al.* (2011), referiu que, 14,8% necessitaram de re-intervenção após 1 ano. Mara *et al.* (2008), referiu que, 2 anos após a intervenção, 32,8% das mulheres necessitou de re-intervenção e Edward *et al.* (2007), referiu que ao fim de 1 ano, também 9% das mulheres necessitaram de re-intervenção.

Em trabalhos publicados, uma pequena percentagem de mulheres tem a necessidade de proceder a novo tratamento devido ao desenvolvimento de novos fibromiomas/crescimento dos fibromiomas pré-existentes. A taxa de falência sugerida por Huang *et al.* (2005), é de cerca de 9,4%, considerando-se falha da técnica quando ocorre a persistência dos sintomas. Neste estudo não obtivemos a avaliação relativa à redução (ou não) dos sintomas, ainda assim, grande parte dos estudos reportam que, a maioria das mulheres (>80%) que se sujeita ao procedimento tem melhorias ao nível da menorreia ao fim de 6 meses (Ravina *et al.* 1995; McLucas *et al.* 2001).

Relativamente ao número de gravidezes, verificamos que existem diferenças significativas entre a população composta por mulheres com fibromiomas e a população controlo, sendo o número de gravidezes, em média, superior na população controlo ($1,22 \pm 1,64$ e $1,78 \pm 0,76$, respetivamente). Não foi possível obter informação sobre as gestações após o procedimento, nem se as gravidezes quantificadas seriam de termo, embora, estudos sugerem que mulheres nulíparas são mais suscetíveis ao desenvolvimento de fibromiomas. Sarkodie *et al.* (2016) e Faerstein *et al.* (2001), referiram um certo nível de proteção da paridade no desenvolvimento deste tipo de tumores.

No nosso trabalho, com recurso à organização por classes das gravidezes da população de fibromiomas e da população controlo, realizámos uma análise para aferir os *Odds Ratio* das

classes em relação às mulheres nulíparas. Atendendo às classes consideradas, através de uma análise de regressão logística, obtivemos um OR (1-2) = 0,009 [0,0001-0,06], $p < 0,001$ e um OR (≥ 3) = 0,019 [0,0002-0,15], $p < 0,001$, comprovando que, a paridade é aparentemente protetora. Isto pode dever-se a uma menor estimulação do músculo liso uterino por parte dos estrogénios durante a gravidez e/ou devido à remodelação uterina pós-parto (Bairds e Dunson, 2003).

Para a nossa população, como já referido, não foi possível obter o número de mulheres que engravidou após o procedimento. Ainda assim, o tratamento é frequentemente reportado como sendo seguro para a intenção de engravidar, sendo que, Firouznia *et al.* (2009), Walker and McDowell. (2006) e Ravina *et al.* (2000), referiram que 60%, 30,5% e 100%, respetivamente, das mulheres que tinham intenção de engravidar, conseguiram após o procedimento.

Através de uma análise de correlação de Spearman, relacionamos parâmetros clínicos da população de mulheres com fibromiomas. Desta análise concluímos que, há uma forte correlação direta entre o volume do fibromioma dominante (VFD) e o volume uterino (VU) ($r=0,711$, $p < 0,001$), sugerindo que, como esperado, quanto maior o volume do fibromioma dominante maior tende a ser o volume uterino. Também para a correlação entre a redução observada do fibromioma dominante (RFD) e a redução uterina (RU) obtivemos valores significativos ($r=0,300$, $p=0,003$), sugerindo que, quanto maior a redução do fibromioma dominante, maior tende a ser a redução uterina. A ligeira correlação inversa entre a redução uterina (RU) e o grau de isquemia obtido ($r= -0,227$, $p=0,027$), sugere que, quanto menor a redução uterina maior o grau de isquemia obtido. Por último, registamos uma ligeira correlação inversa entre o volume uterino (VU) e a percentagem de redução uterina (RU) após o procedimento ($r= -0,226$, $p=0,016$), sugerindo que, como esperado, quanto maior o volume uterino maior tende a ser a sua redução após o procedimento.

A técnica revelou-se eficaz, dentro do período de análise estabelecido, traduzindo uma redução significativa do volume uterino e do volume do fibromioma dominante, bem como o grau de isquemia obtido, em fatores preditivos do *outcome* do procedimento. Para uma melhor análise, sugere-se a obtenção de *follow-up* durante mais tempo na população de fibromiomas, bem como, a obtenção do número de gravidezes obtidas após o procedimento.

5.1.1 Discussão da influência genética nos fibromiomas

A NOS2/iNOS, como já referido, é responsável pela produção de maiores quantidades de NO do que as outras duas isoformas e a sua elevada expressão em tecido tumoral reflete a sua eventual influência no processo patológico. A NOS2/iNOS pode ser induzida por citocinas e hipóxia, sugerindo que, alterações no microambiente em lesões e elevada produção de NO possam apoiar o seu crescimento (Melillo *et al.* 1995). Neste trabalho, analisamos o polimorfismo localizado no intrão 16 (+88G>T), rs9282801, onde pretendemos elucidar um eventual papel no desenvolvimento de fibromiomas.

Para este polimorfismo, em que ocorre uma substituição de G para T, ainda não se estabeleceu uma consequência clara, mas alterações no *splicing*/expressão do gene e/ou aumento da atividade da NOS2/iNOS e síntese de NO são apontados como prováveis modificações (Jorge *et al.* 2010). Buttery *et al.* (1993), sugeriu que a expressão de NOS2/iNOS em células dos neovasos promovem a angiogénese e o suplemento sanguíneo, tendo como consequência o apoio do desenvolvimento de tumores.

Para este polimorfismo, com ambas as populações em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, obtivemos uma ligeira tendência para a diferença na distribuição genotípica entre a população das mulheres com fibromiomas e a população controlo, $p=0,061$ (GG vs. GT + TT) e uma diferença significativa entre as frequências alélicas observadas, $p=0,024$ (G vs. T). Associado a essas diferenças, obtivemos os OR dos genótipos e dos alelos. Para GT+TT, obtivemos um $OR=0,41$ $[0,16-1,01]$, $p=0,065$, que devido ao intervalo de confiança e valor de p , não nos permite concluir acerca do seu grau de proteção em relação ao desenvolvimento de fibromiomas. Relativamente à distribuição alélica, para o alelo T obtivemos o $OR=0,44$ $[0,21-0,91]$, $p=0,026$, que sugere um potencial papel de proteção. O intervalo de confiança e o p -value reforçam estatisticamente esta análise.

Apesar das consequências deste polimorfismo serem pouco claras, se tivermos em conta que, tal como referido, os genótipos GT/TT se associam a uma maior atividade da NOS2/iNOS e consequentemente, a maior produção de NO, o seu papel protetor não é linear. De facto, o NO tem a capacidade de promover a taxa de crescimento dos tumores (Moncada *et al.* 1993) e tem um papel na manutenção do suplemento sanguíneo (Knowles *et al.* 1994). Se for semelhante nos fibromiomas, era esperado que, uma maior atividade da NOS2/iNOS resultasse num fator de suscetibilidade, algo contrário ao obtido. Contudo, esta análise baseia-se apenas num só polimorfismo, que poderá não ser suficiente para aferir uma influência direta no metabolismo do NO. Por outro lado, também a influência do NO na biologia dos tumores carece de maior esclarecimento/investigação.

No decorrer deste trabalho, não se encontraram trabalhos que associem este polimorfismo ao desenvolvimento de fibromiomas, mas os nossos resultados apoiam a hipótese de que, a presença do alelo T, se poderá associar a menor risco no desenvolvimento de fibromiomas.

Para além disso, vários outros fatores poderão ter influenciado os resultados, entre eles, o baixo número de genótipos obtidos com sucesso e uma eventual distribuição heterogénea do polimorfismo entre etnias.

Para o polimorfismo presente no exão 16 (+14C>T; Ser608Leu), rs2297518, do gene NOS2/iNOS, com a população controlo em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e a população patológica em que o equilíbrio não se assume, não detetamos diferenças significativas entre a distribuição genotípica (CC vs. CT+TT), $p=0,108$. Para a distribuição alélica (C vs. T), também não detetamos diferenças significativas, $p=0,086$. Para CT+TT, obtivemos um $OR=0,33$ $[0,09-1,3]$, $p=0,113$, que devido ao intervalo de confiança e valor de p , não nos permite concluir acerca do seu grau de proteção em relação ao desenvolvimento de fibromiomas. Relativamente à distribuição alélica, para o alelo T obtivemos o $OR=0,39$ $[0,12-1,3]$, $p=0,115$, valores que não revelam significância.

Os resultados obtidos sugerem que o polimorfismo poderá não ter um papel relevante no desenvolvimento de fibromiomas uterinos.

Ainda assim as referências que reportam as implicações funcionais deste polimorfismo indicam que, apesar de localizado no domínio catalítico da proteína, a substituição é conservativa, uma vez que envolve 2 aminoácidos com propriedades similares (Canzian *et al.* 2008), sugerindo que, o SNP poderá não resultar numa alteração funcional drástica. No entanto, a substituição pode levar a formas mais ativas de NOS2/iNOS, elevando, consequentemente, a concentração de NO (Holla *et al.* 2006).

Como referido anteriormente, o tamanho reduzido da amostra também poderá ter influenciado o resultado, sendo que, o aumento do número de amostras é importante em trabalhos futuros.

A NOS3/eNOS, é a principal enzima requerida para a produção vascular constitutiva de NO e a existência de polimorfismos, como o de 27-bp VNTR presente no intrão 4 utilizado neste trabalho podem influenciar o nível de NO produzido (Su *et al.* 2011).

Para o polimorfismo presente no intrão 4 (VNTR 4b/a) do gene da NOS3/eNOS, apesar de não verificarmos um resultado significativo na diferença entre a distribuição genotípica (4b4b vs. 4b4a+4a4a), podemos referir que existe uma ligeira tendência para a diferença, $p=0,075$, com um OR (4a4b+4a4a) = 1,4 [0,77-2,75]. Contudo, o intervalo de confiança e o *p-value* obtidos, $p=0,232$, não nos permitem retirar conclusões significativas. Para além do referido, também não obtivemos diferença na distribuição alélica entre as duas populações, $p=0,229$, sugerindo que, para o desenvolvimento de fibromiomas, o polimorfismo, aparentemente, poderá não ser influente. A população controlo neste trabalho é composta por mulheres selecionadas a partir de grupos pré-existentes no laboratório, preferencialmente, deveríamos obter os controlos a partir do mesmo grupo de mulheres, para que fosse representativa e não sujeita a algum enviesamento (Su *et al.* 2011).

Apesar de não existirem estudos publicados que relacionem este polimorfismo com o desenvolvimento de fibromiomas, Gokdeniz *et al.* (2000) referiu que, a expressão de NOS3/eNOS está aumentada no útero de mulheres com esta patologia, provavelmente devido às altas concentrações de estrogénios e que, esta decresce quando as mulheres se submetem a terapia com GnRH. Oh *et al.* (2013) para além de também verificar uma maior expressão de NOS3/eNOS em mulheres com fibromiomas, sugere que, o NO produzido poderá estar diretamente relacionado com a dismenorreia observada, através da estimulação indireta da síntese de prostaglandinas. Uma maior produção de NO, poderá resultar numa maior estimulação angiogénica e posteriormente apoiar o desenvolvimento de fibromiomas, podendo também, associar-se à dismenorreia, um dos principais sintomas referidos e que mais conduzem à suspeita da sua presença (Coronado *et al.* 2000; Fleischer *et al.* 2008; Sabry e Al-Hendy, 2012).

Fatores de crescimento, como TGF- β , que se expressam em resposta à lesão nos tecidos, nos leiomiomas estimulam a produção de matriz extracelular e reduzem a sua degradação. O NO poderá ter um papel na regulação da expressão genética dos genes relacionados com o TGF- β (Saura *et al.* 2005).

Sabe-se que a hipertensão, como referido anteriormente, é um fator de risco para o desenvolvimento de fibromiomas, representando um estado pro-aterogénico que pode aumentar o risco de desenvolver fibromiomas e/ou crescimento do músculo liso uterino, uma vez que, a pressão sanguínea elevada conduz a alterações análogas às alterações ateroscleróticas no músculo liso (Faerstein *et al.* 2001), existindo estudos que relacionam polimorfismos presentes no gene da NOS3/eNOS com a suscetibilidade ao desenvolvimento de hipertensão.

Por outro lado, em Pereira *et al.* (2007) sugere-se que, as evidências tendem a ser mais relevantes perante uma interação genética múltipla e/ou epistase entre vários marcadores presentes no gene do que propriamente a análise de apenas um marcador genético. Não só um aumento do número de amostras seria necessário para compreender o papel do polimorfismo no desenvolvimento de fibromiomas, bem como, preferencialmente completando com uma análise

de haplótipos, esperando-se que seja uma abordagem mais poderosa para detetar suscetibilidade genética (Kitsios e Zintzaras, 2010).

Não obtivemos o doseamento dos níveis séricos de NO, não só devido à falta de amostras biológicas adequadas, mas também devido às suas propriedades, nomeadamente a curta meia-vida e à facilidade com que oxida para nitrito. No entanto, formas de obtenção dos níveis de expressão de NOS3/eNOS nos tecidos ou através da quantificação dos metabolitos, poderão ser ferramentas úteis na realização de análises mais completas.

O folato é um nutriente que tem sido referido como preponderante no desenvolvimento de neoplasias. A sua insuficiência, como já referido, pode conduzir a desregulações na síntese de S-adenosilmetionina, o dador metilo para as reações de metilação (incluindo a do ADN) e na síntese de purinas/timidina, importante na síntese de novo e integridade do ADN, requerendo 5,10-MTHF como coenzima. Alterações na metilação e da integridade do ADN e seus sistemas de reparação podem suportar a tumorigénese uma vez que se ocorre a alteração da expressão de oncogenes (Yang *et al.* 2005).

Polimorfismos funcionais no gene MTHFR podem promover alterações na sua expressão/atividade. Neste trabalho, o polimorfismo analisado diz respeito a uma substituição de C para T no nucleótido 677, resultando numa substituição de alanina para valina. Indivíduos homozigóticos mutados, TT, possuem apenas 30% da atividade normal, enquanto que os indivíduos heterozigóticos, CT, possuem cerca de 65% (Bailey *et al.* 1999). Este efeito deve-se à necessidade de ocorrer a ligação a um cofator, FAD, sendo a afinidade menor para o alelo T, em comparação com o alelo C (Yazdanpanah *et al.* 2008).

Para o polimorfismo da MTHFR, na análise da distribuição genotípica (CC vs. CT+TT) entre a população controlo e a população de fibromiomas, detetámos diferenças significativas, $p < 0,001$. Também para a distribuição alélica obtivemos diferenças com significância ($p < 0,001$). Para CT+TT, o OR=0,46 [0,3-0,69], sugere um potencial efeito protetor para o desenvolvimento de fibromiomas. Na frequência alélica também se obtiveram diferenças significativas ($p < 0,001$), surgindo o alelo T associado a proteção (OR= 0,54 [0,39-0,77]). Ambas as populações se encontravam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Devemos ter em conta que o efeito deste polimorfismo tende a ser anulado quando os suplementos de ácido fólico são os corretos (Girelli *et al.* 1998) e que, para as nossas populações, não possuímos o doseamento dos folatos, não sendo possível aferir, de forma mais concreta, a real influência do polimorfismo.

Nas pesquisas efetuadas, não encontramos estudos que apoiem os resultados obtidos, uma vez que o polimorfismo nunca foi estudado na patologia em questão até à data. Contudo, sabe-se que os genótipos associados a proteção têm uma menor atividade enzimática, conduzindo à acumulação de Hcy. Este estado de híper-homocisteinemia pode promover uma redução na biodisponibilidade do NO, através da diminuição do transporte de arginina, importante na biossíntese de NO (Domagala *et al.* 1998; Leoncini *et al.* 2003). A possível influência do NO no desenvolvimento de fibromiomas, considerando os polimorfismos estudados, foi discutida em cima e essa eventual redução de substrato para a sua produção poderá ser benéfica, uma vez que, permite que o NO disponível seja menor e consequentemente não seja tão determinante na angiogénese e crescimento dos fibromiomas. Contudo, os mecanismos que envolvem a interação entre o MTHFR, metabolismo do folato e o desenvolvimento de fibromiomas, bem como a sua real importância a nível funcional, requerem mais investigação. O metabolismo do folato é

complexo e vários fatores podem contribuir para a sua desregulação. A riboflavina, por exemplo, tem sido apontada como protetora quando associada à variante mutada, TT, do polimorfismo (Marchand *et al.* 2005; Van den Donk *et al.* 2005).

Kang *et al.* (2005), indicou que, a provável interação entre polimorfismos presentes no gene e o estado de metilação das ilhas CpG relacionadas com oncogenes, especificamente em mulheres com pelo menos um alelo mutado, T, é de um menor nível de hipermetilação aberrante na região do promotor da metil-guanina metil-transferase (MGMT), um gene reparador de ADN, sugerindo um efeito protetor.

Mais estudos são necessários para a obtenção de maior conhecimento relativamente à influência do folato no estado de metilação em genes importantes no desenvolvimento de fibromiomas. Investigações ao nível da hipermetilação de genes que se possam associar ao desenvolvimento de fibromiomas permitem a obtenção de eventuais biomarcadores moleculares e na identificação de genes alvo para futuras terapêuticas.

A influência de uma possível distribuição heterogênea do polimorfismo no estudo foi testada através da obtenção de uma população controlo de etnia africana a partir de uma plataforma (*Ensemble*), visto que a maioria das mulheres que compõem a população de mulheres com fibromiomas tem essa origem. Os resultados são contrários aos obtidos na análise entre as nossas duas populações, onde obtivemos um OR (CT+TT) = 2,04 [1,4-3,1], $p=0,001$, com um intervalo de confiança e respetivo valor de p que apoiam o significado estatístico de que representa um fator de suscetibilidade no desenvolvimento de fibromiomas. Também para a frequência alélica obtivemos um OR (T) = 2,7 [1,9-3,9], $p<0,001$, sugerindo que o alelo T representa um fator de suscetibilidade.

Para a análise em que pretendíamos aferir sobre a influência dos polimorfismos estudados na modulação dos parâmetros clínicos obtidos, obtivemos resultados significativos apenas para a distribuição do local do fibromioma para o polimorfismo localizado no intrão 16 do gene da iNOS/NOS2 ($p<0,001$). A sua relevância para a influência do local onde se formam os fibromiomas carece de mais investigação.

As conclusões a retirar carecem de mais investigação que poderá passar pela criação de populações com critérios de seleção mais apertados de forma a evitar que ocorram enviesamentos, uma vez que a população obtida através da plataforma não contempla idades, sexo e outras características potencialmente importantes para uma análise mais específica.

5.2 Discussão dos resultados da população de mulheres com carcinoma do colo do útero

O carcinoma do colo do útero, sendo um tumor maligno e um dos mais comuns nas mulheres, representa um problema de saúde pública considerável, tendo bastante atenção por parte da comunidade médico/científica. Devido ao elevado interesse, já se encontram estabelecidos de forma relativamente clara, os padrões epidemiológicos e etiológicos da doença. Ainda assim, sendo dotada de uma complexidade de fatores e cofatores e devido ao flagelo que ainda representa para as mulheres, o estudo de mecanismos fisiológicos e moleculares ainda têm um enorme interesse nos avanços do conhecimento à cerca desta patologia maligna.

Neste trabalho, devido à falta de complementaridade entre as bases de dados das duas populações consideradas (carcinomas do colo do útero *vs.* população controlo), não nos foi

possível aferir muito à cerca de fatores extrínsecos, para além do número de gravidezes e hábitos tabágicos.

Uma das características demográficas obtidas foi os hábitos tabágicos. Face à população controlo, detetamos diferenças entre ambas ($p < 0,001$), sendo os hábitos tabágicos mais comuns nas mulheres da população com carcinoma do colo do útero (24,7% vs. 5,5%), verificando-se que, o risco de mulheres fumadoras para o desenvolvimento de lesões no colo do útero é 5,7 [2,86-11,2] vezes superior relativamente às mulheres que não possuem hábitos tabágicos ($p < 0,001$). Estes resultados são concordantes com os resultados referidos em estudos publicados em Portugal (Matos *et al.* 2005), e pode dever-se a vários aspetos, entre eles, o clorofórmio e o etanol presentes nos cigarros, pois têm a capacidade de atuar como estimuladores da proliferação, conduzindo ao aumento da angiogénese, do VEGF e através da promoção do desenvolvimento de tumores (Canzian *et al.* 2008; Jorge *et al.* 2010). O consumo tabágico também pode contribuir para o desenvolvimento da carcinogénese, uma vez que, a exposição direta ao ADN presente nas células cervicais epiteliais à nicotina e à cotinina e outros mecanismos que envolvem exposição a produtos metabólicos que resultam das reações dos componentes dos cigarros, como hidrocarbonos policíclicos e aminas aromáticas (Fonseca-Moutinho, 2011).

O tempo de exposição no nosso estudo não foi considerado, mas sabe-se que, os efeitos a longo termo podem afetar a proliferação celular, inibir a apoptose e estimular os fatores de crescimento vascular (Gritz *et al.* 2005). Também o sistema imune das mulheres poderá determinar o efeito do tabaco na carcinogénese (Zeidel *et al.* 2002).

A multiparidade parece associar-se ao desenvolvimento de carcinoma do colo do útero (Ferreira e Galvão, 2009). Relativamente aos nossos resultados, podemos verificar que, a presença de 1-2 gravidezes pode ter um papel protetor no desenvolvimento de carcinomas do colo do útero (OR (1-2 gravidezes) = 0,024 [0,003-0,186], $p < 0,001$) e que, apesar de termos um valor superior de mulheres com ≥ 3 gravidezes no grupo patológico, o OR (≥ 3 gravidezes) = 0,23 [0,03-1,85], $p = 0,168$, não é significativo. Isto pode dever-se a diferenças entre a população controlo e a população de mulheres com carcinoma do colo do útero, carecendo de mais investigação.

5.2.1 Discussão da influência genética no carcinoma do colo do útero

Como já referido, o NOS3/eNOS, é a principal enzima requerida para a produção vascular de NO e o polimorfismo de 27-bp VNTR presente no intrão 4 pode, tal como outros polimorfismos deste gene, influenciar os níveis de NO produzido (Su *et al.* 2011).

Para este polimorfismo, detetamos diferenças significativas na distribuição genotípica entre as populações (4a4a vs. 4b4b+4b4a), $p = 0,032$, com OR (4b4b+4b4a) = 7,5 [0,88-63], $p = 0,066$. Para a distribuição alélica também não observamos diferenças ($p = 0,99$). Apesar da diferença na distribuição genotípica, a distribuição alélica e respetivos valores de p , não nos permitem concluir se existe uma associação entre o desenvolvimento de carcinomas do colo do útero e este polimorfismo.

Relativamente a trabalhos publicados, já existem alguns referentes à influência do polimorfismo nesta patologia ou noutras patologias malignas, como o caso do cancro da próstata (Medeiros *et al.* 2003; Amasyali *et al.* 2012) e do cancro da mama (Ramirez-Patino *et al.* 2013) contudo, os resultados não são concordantes com os obtidos neste estudo. Sugerindo que, as alterações que este polimorfismo possa implicar na expressão da NOS3/eNOS e,

consequentemente, na produção de NO, talvez não se tenham tornado visíveis devido ao número de amostras ou fatores associados com as populações utilizadas, carecendo de mais investigação.

Para além disso, tal como referido anteriormente, as evidências poderão ser mais relevantes perante uma interação genética múltipla entre vários marcadores moleculares presentes no gene do que a análise de apenas um marcador (Pereira *et al.* 2007). Uma análise, preferencialmente completa com uma análise de haplótipos, poderia tornar a abordagem estatística mais poderosa na deteção de suscetibilidades genéticas (Kitsios e Zintzaras, 2010), uma vez que, a análise isolada de um polimorfismo poderá não revelar influência devido ao seu pequeno contributo.

Para o polimorfismo da MTHFR, na análise da distribuição genotípica (CC vs. CT+TT) do polimorfismo C677T entre a população controlo e a população de mulheres com carcinoma do colo do útero, não detetamos diferenças significativas para as distribuições genotípicas ($p=0,593$) e alélicas ($p=0,901$). Ambas as populações se encontram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Como referido, uma ingestão correta de ácido fólico pode ser suficiente para anular os efeitos da presença do polimorfismo e diversos estudos publicados têm sugerido que nas mulheres com ingestão correta de ácido fólico há uma menor persistência do HPV (Rosl *et al.* 1993; Sedjo *et al.* 2002), sendo espetável que, o genótipo heterozigótico e o homozigótico recessivo pudessem representar risco quando presentes em mulheres com défice de ácido fólico. O deficiente estado de folato encontra-se relacionada com a incorporação anormal de uracilo (em substituição da timina), conduzindo a lesões na cadeia de ADN devido a capacidade de reparação debilitada (Eichholzer *et al.* 2001; Powers, 2005).

Piyathilake *et al.* (2000), referiu que a mutação representa risco para o desenvolvimento do carcinoma do colo do útero, tal como a multiparidade, e que isso se deve ao exigente requerimento de folato, tornando as mulheres mais suscetíveis. Estudos sugerem que uma dieta rica em fruta e vegetais, e consequente correta ingestão de folato, possam ser protetoras para o desenvolvimento de carcinoma do colo do útero (Potischman *et al.* 1996; Hirose *et al.* 1998; Steinmetz *et al.* 1996). Também Weinstein *et al.* (2001) e Ziegler *et al.* (2002), sugerem um aumento do risco em mulheres com elevadas concentrações de homocisteína, concordante com os estudos referidos anteriormente, que associam a mutação (e consequente aumento de Hcy no plasma, devido à menor atividade) como um fator de risco.

Por outro lado, Zoodsma *et al.* (2005) referiu uma redução do risco em mulheres portadoras do genótipo heterozigótico e homozigótico mutado e Hunao *et al.* (2004) referiu um efeito protetor da mutação. A influência do polimorfismo no carcinoma do colo do útero ainda se encontra por esclarecer, devido aos estudos contraditórios que têm sido publicados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fibromiomas representam os tumores ginecológicos benignos mais comuns nas mulheres, em idade reprodutiva, representando um problema de saúde pública e nos custos económicos que representam para a sociedade. A maior disponibilidade de técnicas permite uma melhor abordagem à patologia, tendo em conta fatores biológicos e sociais das mulheres envolvidas. Devido às discrepâncias entre a maioria dos estudos publicados, maior investigação é necessária para aferir sobre os efeitos das características tumorais na eficácia da técnica de embolização de fibromiomas uterinos.

A técnica de embolização dos fibromiomas uterinos (EFU) tem revelado ser segura e eficaz, sendo o seu principal objetivo a eliminação dos sintomas associados através de um procedimento mais simples e seguro que os principais procedimentos utilizados (miomectomia e histerectomia).

Neste estudo, para além da análise das características clínicas utilizadas para avaliar a eficácia da embolização de fibromiomas uterinos (volumes do fibromioma dominante, uterino e grau de isquemia), também se pretendeu identificar fatores genéticos potencialmente envolvidos no desenvolvimento de fibromiomas.

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- O polimorfismo presente no intrão 16 (+88G>T) da NOS2/iNOS parece ser um fator de proteção para o desenvolvimento de fibromiomas. Enquanto que o polimorfismo presente no exão 16 (+16C>T) não revelou influência significativa no desenvolvimento de fibromiomas.
- O polimorfismo presente no intrão 4 (27bp-VNTR) da NOS3/eNOS, não aparenta ter um papel na modulação do risco de desenvolvimento de fibromiomas. Ainda assim, as evidências referidas por outros autores reforçam a necessidade de se obterem mais amostras para que se possa esclarecer melhor a sua influência.
- O polimorfismo C667T do gene MTHFR aparenta ser um fator de proteção no desenvolvimento de fibromiomas quanto às populações consideradas em estudo. Por sua vez, a análise efetuada com um grupo controlo de origem africana revelou resultados contrários aos obtidos, surgindo o polimorfismo associado a suscetibilidade no desenvolvimento de fibromiomas. O mecanismo pelo qual a mutação possa promover esta proteção evidente no desenvolvimento de fibromiomas ainda não é claro, carecendo de mais investigação, uma vez que através da obtenção de uma população controlo a partir da plataforma não temos acesso a características demográficas e clínicas.
- Os polimorfismos estudados na população de mulheres com fibromiomas, estatisticamente, apesar da significância obtida para a localização do fibromioma dominante para o polimorfismo localizado no intrão 16 (+88G>T) da iNOS/NOS2, na sua maioria, não influenciam os parâmetros clínicos avaliados.

O carcinoma do colo do útero, apesar dos esforços preventivos e da investigação que permitem atualmente o estabelecimento de vários fatores de risco associados ao seu desenvolvimento, ainda representa um dos tumores mais comuns nas mulheres, sendo a sua investigação extremamente necessária.

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- A multiparidade, apesar de ser um fator de risco bastante referido, neste trabalho, não se verifica essa influência. Este resultado deve-se, provavelmente, a diferenças entre as populações consideradas.
- Os hábitos tabágicos associam-se a um risco 5,7 [2,86-11,2] vezes superior para o desenvolvimento de lesões no colo do útero face às mulheres não fumadoras.
- O polimorfismo 27bp-VNTR presente no intrão 4 na NOS3/eNOS, apesar de diferenças significativas na distribuição genotípica ($p=0,032$), após o ajuste das idades, não se verificaram conclusões significativas ao nível da suscetibilidade/proteção.
- O polimorfismo C677T, presente no gene da MTHFR, não revelou diferenças estatísticas entre as duas populações consideradas. A obtenção de um maior número de amostras é necessária para que se esclareça uma eventual influência do polimorfismo.

Por fim, através da análise dos resultados para ambos os tumores (carcinoma do colo do útero vs. fibromiomas) e para os polimorfismos considerados, não identificamos fatores de suscetibilidade comuns, algo espetável, uma vez que, apenas 1% dos fibromiomas tendem a sofrer malignação, sugerindo que as patologias partilham mecanismos de desenvolvimento diferentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulkader, J. C., F. Gude, M. Fraga, J. Varela-Duran, F. Barreiro, *et al.* 2002. Predictors of malignant behaviour in gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological study of 34 cases. *Eur J. Surg* 168(5): 288-96.

Aleman, L., M. Saunier, I. Alvarado, B. Quirós, J. Salmeron *et al.*, 2015. HPV DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *Int J. Cancer* 136(1): 98-107.

Alderton, W. K., C. E. Cooper, R. G. Knowles, 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615.

Alkatis, M. S. and M. J. Crabtree, 2012. Recoupling the cardiac nitric oxide synthases: tetrahydrobiopterin synthesis and recycling. *Curr. Heart Fail Rep.* 9(3): 200-10.

Amasyali, A. S., C. Kucukgergin, S. Erdem, O. Sanli, S. Seckin, *et al.*, 2012. Nitric Oxide Synthase (Enos4/b) Gene polymorphism is associated with tumor recurrence and progression in superficial bladder cancer case. *J. Urol.* 188(6): 2398-2403.

Andrews, R. T. and P. H. Brown, 2000. Uterine arterial embolization: factors influencing patient radiation exposure. *Radiology* 217: 713-722.

Antoniades, C., C. Shirodaria, N. Warrick, S. Cai, J. de Bono *et al.*, 2006. 5-Methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels – Effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation* 114: 1193-1201.

Arici, A., I. Sozen, 2000. Transforming growth factor-beta3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil Steril* 73(5): 1006-11.

Bailey, L. B. and J. F. Gregory, 1999. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact in folate requirement. *J Nutr* 129: 919-922.

Baird, D. D., J. S. Kesner, D. B. Dunson, 2006. Luteinizing hormone in premenopausal women may stimulate uterine leiomyomata development. *J. Soc Gynecol Investig.* 13(2):130-135.

Baird, D. D. and D. B. Dunson, 2003. Why is parity protective for uterine fibroids? *Epidemiology* 14(2): 247-250.

Baird, D. D., D. B. Dunson, M. C. Hill, D. Cousins, J. M. Schectman, 2003. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am J. Obstet Gynecol* 188(1): 100-107.

Bicho, Maria Clara Gomes: Contribuição para o Estudo e Biomarcadores e Cofactores no Cancro do Colo do Útero, Porto, 2011. Tese de Doutoramento.

Bicho, M. C., A. P. Silva, A. Matos, R. M. Silva, M. D. Bicho, 2009. Sex steroid hormones influence the risk for cervical cancer: modulation by haptoglobin genetic polymorphism. *Cancer Genet Cytogenet* 191: 85-89.

- Bosch, F. and N. Muñoz, 2002. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 89: 183-190.
- Burbank, F., 2004. Childbirth and myoma treatment by uterine artery occlusion: do they share a common biology? *J. Am Assoc Gynecol Laparosc* 11(2): 138-152.
- Burchell, A. N., A. Rodrigues, V. Moravan, P. Tellier, J. Hanley, *et al.* 2014. Determinants of prevalent human papillomavirus in recently-formed heterosexual partnerships: A dyadic-level analysis. *J. Infect Dis* 210(6): 846-852.
- Burn, P. R., J. M. McCall, R. J. Chinn, A. Vashisht, J. R. Smith, *et al.* 1999. Uterine fibroleiomyoma: MR imaging appearances before and after embolization of uterine arteries. *Radiology* 217: 228-235.
- Buttery, L. D. K., D. R. Springall, S. P. Andrade, V. Riveros-Moreno, I. Hart, *et al.* 1993. Induction of nitric oxide synthase in the neo-vasculature of experimental tumours in mice. *J. Pathol* 171: 311-319.
- Blount, B. C., M. M. Mack, C. M. Wehr, J. T. MacGregor, R. A. Hiatt, *et al.* 1997. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 3290-3295.
- Bruni, L., M. Diaz, L. Barrionuevo-Rosas, R. Herrero, F. Bray, *et al.* 2016. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis. *Lancet Glob Health* 4: e453-463.
- Canavan, T. P. and N. R. Doshi, 2000. Cervical cancer. *Am Fam Physician* 61 (5): 1369-76.
- Canzian, F., S. Franceschi, M. Plummer, L. van Doorn, Y. Lu, *et al.* 2008. Genetic polymorphisms in mediators of inflammation and gastric precancerous lesions. *Eur J. Cancer Prev* 17: 178-183.
- Castelão, C. D., 2013. Papel dos mecanismos envolvendo esteroides sexuais (E1 e E2), sua variação genética e biomarcadores circulantes na etiopatogenia de tumores ginecológicos (Leiomiomas e Cancro do colo do útero). Tese de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Faculdade de Ciências – Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Castellsagué, X., 2008. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 110: S4-S7.
- Castellsagué, X., F. Bosch, N. Muñoz, 2002. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 89: 191-199.
- Cardozo, E. R., A. D. Clark, N. K. Banks, M. B. Henne, B. G. Stegmann, *et al.* 2012. The estimated annual cost of uterine leiomyomata in the United States. *Am J. Obstet Gynecol*; 206: 211: e1-9.

Ciarnela, P., S. Islam, F. M. Reis, P. C. Gray, E. Bloise, *et al.* 2011. Growth factors and myometrium: biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Hum Reprod Update* 17(6): 772-790.

Conceição, J. C. J., 2005. *Ginecologia Fundamental*, pp. 9-20, Editora Atheneu, Rio de Janeiro.

Conn, P. M. and W. F. Crowley Jr., 1994. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med.* 45: 391-405.

Coronado, G. D., L. M. Marshall, S. M. Schwartz, 2000. Complications in pregnancy, labor, and delivery with uterine leiomyomas: a population-based study. *Obstet Gynecol* 95(5): 764-769.

Chiaffarino, F., F. Parazzini, C. La Vecchia, S. Marsico, M. Surace, *et al.* 1999. Use of oral contraceptives and uterine fibroids: results from a case-control study. *BJOG* 106: 857-860.

Choi, S.W. and J. B. Mason, 2002. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J. Nutr.* 132(8): 2413- 2418.

Choi, S.W., Y. I. Kim, J. N. Weitzel, J. B. Mason, 1998. Folate depletion impairs DNA excision repair in the colon of the rat. *Gut* 43(1): 93-99.

Clifford, G., S. Franceschi, M. Diaz, N. Muñoz, L. Villa, 2006. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 24: S26-S34.

Cramer, S. F. and A. Patel, 1990. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J. Clin Pathol* 94(4): 435-438.

Crott, J. W., S. T. Mashiyama, B. N. Ames, M. F. Fenech, 2000. MTHFR C667T polymorphism does not alter folic acid deficiency-induced uracil incorporation into primary human lymphocyte DNA in vitro. *Carcinogenesis (Lond.)*, in press.

D'Souza, G., A. R. Kreimer, R. Viscidi, M. Pawlita, C. Fakhry, *et al.* 2007. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J. Med* 356: 1944-56.

Daling, J., M. Madeleine, S. Schwartz, K. Shera, J. Carter *et al.* 2002. A Population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. *Gynecol Oncol* 84: 263-270.

Davis, B. J., Haneke, K. E., Miner, K., Kowalik, A., Barrett, *et al.* 2009. The Fibroid Growth Study: Determinants of Therapeutic Intervention. *J Womens Health* 18(5): 725-732.

De Martel, C., J. Ferlay, S. Franceschi, J. Vignat, F. Bray, *et al.* 2012. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 13(6): e607-15.

De Sanjosé, S., M. Diaz, X. Castellsagué, G. Clifford, L. Bruni, *et al.* 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 7(7): 453-459.

Diler, S. B. and A. Öden, 2016. The T-786C, G894T, and Intron 4 VNTR (4a/b) Polymorphisms of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene in Prostate Cancer Cases. *Russ J. Genet* 52 (2): 220-225.

Dochez, C., J. J. Borgers, R. Verhelst, H. Rees, 2014. HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update. *Vaccine* 32: 1595-1601.

Domagala, T. B., A. Undas, M. Libura, A. Szczeklik, 1998. Pathogenesis of vascular disease in hyperhomocysteinaemia. *J. Cardiovasc Risk*. 5(4):239-471.

Doridot, V., J. B. Dubuisson, C. Chapron, A. Fauconnier, K. Babaki-Fard, 2001. Recurrence of leiomyomata after laparoscopic myomectomy. *J. Am Assoc Gynecol Laparosc* 8(4): 495-500.

Dusse, L. M. S., L. M. Vieira, M. G. Carvalho, 2013. Revisão sobre óxido nítrico. *J. Bras Patol Med Lab* 39(4): 343-350.

Eichholzer M., J. Lüthy, U. Moser, B. Fowler, 2001. Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence (review article). *Swiss Med Wkly* 131:539-49.

Eckel, R., S. Grundy, P. Zimmet, 2005. The metabolic syndrome. *Lancet* 365:1415–28.

Edwards, D. R. V., D. D. Baird, K. E. Hartmann, 2012. Association of age at menarche with increasing number of fibroids in a cohort of women who underwent standardized ultrasound assessment. *Am. J. Epidemiol.* 178(3): 426-433.

Edwards, R. D., J. G. Moss, M. A. Lumsden, O. Wu, L. S. Murray, *et al.* 2007. Uterine-artery embolization versus surgery for symptomatic uterine fibroids. *N Engl J. Med* 356:360-70.

Eldar-Geva, T., S. Meagher, D. L. Healy, V. MacLachlan, S. Breheny, *et al.* 1998. Effect of intramural, subserosal and submucosal uterine fibroids on the outcome of assisted reproductive technology treatment. *Fertil Steril* 70(4): 687-691.

Espey, M. G., K. M. Miranda, D. D. Thomas, S. Xavier, D. Citrin, *et al.* 2002. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 962: 195-206.

Faerstein, E., M. Szklo, N. B. Rosenshein, 2001. Risk factors for uterine leiomyoma: a practice-based case-control study. II. Atherogenic risk factors and potential sources of uterine irritation. *Am. J. Epidemiol.* 153: 11-19.

Fallowfield, J. A., M. Mizuno, T. J. Kendall, C. M. Constandinou, R. C. Benyon, *et al.* 2007. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J. Immunol*, 178(8): 5288-5295.

Farhi, J., J. Ashkenazi, S. Feldberg, D. Dicker, R. Orvieto, *et al.* 1995. Effect of uterine leiomyomata on the results of in-vitro fertilization treatment. *Hum Reprod* 10(10): 2576-2578.

Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, *et al.* 2014. Cancer incidence and mortality worldwide: sources methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136(5): 359-386.

Ferlay J., E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. Coebergh, *et al.* 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J. Cancer* 49:1374–1403.

Ferreira, M. L. S. M., M. T. G. Galvão, 2009. Avaliação do risco de cancer de colo do útero em trabalhadoras da industria têxtil. *Cienc Cuid Saude* 8(1):86-92.

Fields, K. R., L. S. Neinstein, 1996. Uterine myomas in adolescents: case reports and a review of the literature. *J. Pediatr Adolesc Gynecol* 9(4): 195-198.

Firouznia, K., H. Ghanaati, M. Sanaati, H. Jalali, M. Shakiba, 2007. Uterine artery embolization in 101 cases of uterine fibroids: do size, location and number of fibroids affect therapeutic success and complications? *Cardiovasc Intervent Radiol* 31: 521-526.

Fonseca-Moutinho, J. A., 2011. Smoking and Cervical Cancer. *ISRN Obstet Gynecol*, 2011, 847684.

Forman, D., C. de Martel, C. J. Lacey, I. Soerjomataram, J. Lortet-Tieulent, *et al.* 2012. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vaccine* 30(5): F12–F23.

Fukumura, D., S. Kashiwagi, R. K. Jain, 2006. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 6:521-534.

Flake, G. P., J. Andersen, D. Dixon, 2003. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: A review. *Environ Health Perspect* 111(8): 1037-1054.

Fleischer, R., G. Weston, B. Vollenhoven, P. Rogers, 2008. Pathophysiology of fibroid disease: angiogenesis and regulation of smooth muscle proliferation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 22: 603-614.

Flynn, M., M. Jamison, S. Datta, E. Myers, 2006. Health care resource use for uterine fibroid tumors in the United States. *Am J. Obstet Gynecol* 195(4): 955-964.

Franco, E. L., S. Sanjosé, T. R. Broker, M. A. Stanley, M. Chevarie-Davis *et al.* 2012. Human Papillomavirus and cancer prevention: gaps in knowledge and prospects for research, policy and advocacy. *Vaccine* F175-F182.

Friso, S. and S. Choi, 2005. Gene-nutrient interactions in one-carbon metabolism. *Curr. Drug Metab.* 6:37-46.

Friso, S., S. W. Choi, D. Girelli, J. B. Mason, G. G. Dolnikowski, *et al.* 2002. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(8): 5606-5611.

Frisch, M., B. Glimelius, A. J. C. Van den Brule, J. Wohlfahrt, J. L. M. Meijer, *et al.* 1997. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N. Engl J. Med* 337 (19): 1350-8.

Froeling, V., K. Meckelburg, N. F. Schreiter, C. Scheurig-Muenkler, J. Kamp, *et al.* 2013. Outcome of uterine artery embolization versus MR-guided high-intensity focused ultrasound treatment for uterine fibroids: long-term results. *Euro J. Radiol* 82(12):2265-9.

Froese, D. S., M. Huemer, T. Suormala, P. Burda, D. Coelho, *et al.* 2016. Mutation update and review of severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Hum Mutat* 37:427-438.

Frosst, P., H. J. Blom, R. Milos, R. Goyette, C. A. Sheppard, *et al.* 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase [letter]. *Nat Genet* 10:111–3.

Gallagher, C. S and C. C. Morton, 2016. The genetic association studies in uterine fibroids: risk alleles presage the path to personalized therapies. *Semin Reprod Med.* 34(4): 235-241.

Girelli, D. S. Friso, E. Trabetti, O. Olivieri, C. Russo, *et al.* 1998. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: Evidence for an important genetic-environmental interaction. *Blood* 91(11): 4158-4163.

Goodwin, S. C., B. McLucas, M. Lee, G. Chen, R. Perrela, *et al.* 1999. Uterine artery embolization for the treatment of uterine leiomyomata: midterm results. *J. Vasc Interv Radiol* 10(9):1159–1165.

Goodwin, S. C., S. Vedantham, B. McLucas, A. E. Forno, R. Perrella, 1997. Preliminary experience with uterine artery embolization for uterine fibroids. *J. Vasc Interv Radiol* 8(4): 517-526.

Goyette, P., J. S. Sumner, R. Milos, A. M. Duncan, D. S. Rosenblatt, *et al.* 1994. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 7(2): 195-200.

Gokdeniz, R., S. Ozen, B. Mizrak, N. Bazoglu, 2000. GnRH agonist decreases endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in leiomyoma. *Int J Gynaecol Obstet* 70: 347-352.

Gritz, E. R., C. Dresler, L. Sarna, 2005. Smoking, the missing drug interaction in clinical trials: ignoring the obvious. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 2287-2293 in Fonseca-Moutinho, 2011. Smoking and cervical cancer. *International Scholarly Research Network ISRN Obstetrics and Gynecology* 2011: 847684.

Hausen, H. Z., 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-350.

Hausen, H. Z., 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1288: F55-78.

Hanafi, M., 2005. Predictors of leiomyoma recurrence after myomectomy. *Obstet Gynecol.* 105(4): 877-81.

Heideman, S. A. M., T. Waterboer, M. Pawlita, P. D. Diemen, I. Nindl, *et al.* 2007. Human papillomavirus-16 is the predominant type etiologically involved in penile squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 25.29: 4550-4556.

Heijmans, B. T., J. M. Boer, H. E. Suchiman, C. J. Cornelisse, R. G. Westendorp, *et al.* 2003. A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer Res* 63: 1249-1253.

Heinecke, J. L., L. A. Ridnour, R. Y. S. Cheng, C. H. Switzer, M. M. Lizardo, *et al.* 2012. Tumor microenvironment-based feed-forward regulation of NOS2 in breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(17): 6323-6328.

Hebbbar, S., V. Chaya, L. Rai, A. Ramachandran, 2014. Factors influencing endometrial thickness in postmenopausal women. *Ann Med Health Sci Res* 4:608–14.

Heltianu, C., C. Guja, S. Manea, 2011. Genetic Determinants of Microvascular Complications in Type 1 Diabetes pp. 3-28. INTECH Open Access Publisher.

Henao, O. L., C. J. Piyathilake, J. W. Waterbor, E. Funkhouser, G. L. Johanning, *et al.* 2004. Women with polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase (MS) are less likely to have cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2 or 3. *Int J. Cancer*;113(6):991–7.

Hirose, K, N. Hamajima, T. Takezaki, T. Huroishi, K. Kuzuya, *et al.* 1998. Smoking and dietary risk factor for cervical cancer at different age group in Japan. *J. Epidemiol.* 8:6 –14.

Hirst, A., S. Dutton, O. Wu, A. Briggs, C. Edwards, *et al.* 2008. A multi-centre retrospective cohort study comparing the efficacy, safety and cost-effectiveness of hysterectomy and uterine artery embolization for the treatment of symptomatic uterine fibroids. The HOPEFUL study. *Health Technol Assess.* 12(5): 1-248.

Holla L. I., A. Stejskalova, V. Znojil, A. Vasku, 2006. Analysis of the inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms in Czech patients with atopic diseases. *Clin Exp Allergy*, 36:1592-1601.

Huang, J. Y. J., S. Kafy, A. Dugas, D. Valenti, T. Tulandi, 2005. Failure of uterine fibroid embolization. *Fertil Steril* 85(1): 30-35.

Hustad, S., J. Schneede, P. M. Ueland, 2000. Riboflavin and methylenetetrahydrofolate reductase. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin. Chem.* 46: 1065-1071.

Hutter, J. N. and C. F. Decker, 2016. Human papillomavirus infection. *Dis Mon* 62: 294-300.

Ishikawa, H., K. Ishi, V. A. Serna, R. Kakazu, S. E. Bulun, *et al.* 2010. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology* 151(6): 2433-2442.

Islam, S., O. Protic, P. Stortoni, G. Grechi, P. Lamanna, *et al.* 2013. Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Fertil Steril* 100: 178-93.

Kang, S., J. W. Kim, G. H. Kang, N. H. Park, Y. S. Song, *et al.* 2005. Polymorphism in folate- and methionine-metabolizing enzyme and aberrant CpG island hypermethylation in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 96(1): 173– 80.

Kelsey, T. W., E. Ginbey, M. M. Chowdhury, L. E. Bath, R. A. Anderson, *et al.* 2016. A validated normative model for human uterine volume from birth to age 40 years. *Plos One* 11(6): e0157375.

Kim, Y. I., H. W. Baik, K. Fawaz, T. Knox, Y. M. Lee, *et al.* 2001. Effects of folate supplementation on two provisional molecular markers of colon cancer: a prospective, randomized trial. *Am J Gastroenterol* 96:184–95.

Kitsios, G. D. and E. Zintzaras, 2010. An NOS3 haplotype is protective against hypertension in a caucasian population. *Int J. Hypertens* 2010: 1-7.

Koutsky, L., 1997. Epidemiology of Genital Human Papillomavirus Infection. *Am J. Med* 102: 3-8.

Kulkarni, M. R., I. Dutta, D. K. Dutta, 2016. Clinicopathological study of uterine leiomyomas: a multicentric study in rural population. *J. Obstet Gynaecol. India.* 66(1):412-416.

Kumar, D., S. Basu, L. Parija, D. Rout, S. Manna, *et al.* 2015. Curcumin and Ellagic acid synergistically induce ROS generation, DNA damage, p53 accumulation and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.* 81: 31-37.

Khan, A.T., M. Shehmar, J. K. Gupta, 2014. Uterine fibroids: current perspectives. *Int J. Womens Health*; 296:95-114.

Knowles, R. G. and S. Moncada, 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 298: 249–258

Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, *et al.* 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin* 61: 69-90.

Jorge, Y. C., M. C. Duarte, A. E. Silva, 2010. Gastric cancer is associated with NOS2-954G/C polymorphism and environmental factors in a brazilian population. *BMC Gastroenterology* 10:64.

Laughlin, S. K., J. C. Schroeder, D. D. Baird, 2010. New Directions in the epidemiology of uterine fibroids. *Semin Reprod Med* 28(3): 204-217.

Larsson, S. C., E. Giovannucci, A. Wolk, 2006. Folate intake, MTHFR polymorphisms and risk of esophageal, gastric and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology* 131: 1271-1283.

Lee, K., D. Kang, K. S. Park, S. I. Berndt, D. Reding, *et al.* 2009. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 30(4): 621-625.

Leoncini G, R. Pascale, M. G. Signorello, 2003. Effects of homocysteine on L-arginine transport and nitric oxide formation in human platelets. *Eur J. Clin Invest.* 33(8):713-9.

Leto, M. G. P., A. M. Porro, G. F. S. Júnior, J. Tomimori, 2011. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *Na Bras Dermatol* 86(2): 306-17.

Ligon, A. H. and C. C. Morton, 2001. Leiomyomata: heritability and cytogenetic studies. *Hum Reprod Update* 7(1):8-14.

Lorenz, A., T. Kahre, E. Mihailov, T. Nikopensius, 2014. Are Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene Polymorphisms C677T and A1298C Associated with Higher Risk of Pediatric Migraine in Boys and Girls? *J. Biomed Sci Eng*, 7, 464 – 472.

Luoto, R., E. M. Rutanen, A. Auvinen, 2001. Fibroids and hypertension. A cross-sectional study of women undergoing hysterectomy. *J. Reprod Med* 46(4): 359-364.

Lumbiganon, P., S. Rugpao, S. Phandhu-fung, M. Laopaiboon, N. Vudhikamraksa, *et al.* 1995. Protective effect of depot-medroxyprogesterone acetate on surgically treated uterine leiomyomas: a multicentre case-control study. *Br J. Obstet Gynaecol* 103:909-914.

Ma, J., M. J. Stampfer, E. Giovannucci, C. Artigas, D. J. Hunter, *et al.* 1997. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions and risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 57: 1098-1102.

Maheux, R., C. Guilleateau, A. Lemay, A. Bastide, A. T. A. Fazekas, 1985. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist and uterine leiomyoma: A pilot study. *Am J. Obstet Gynecol*; 152: 1034-8.

Manyonda, I. T., M. Bratby, J. S. Horst, N. Banu, M. Gorti, *et al.* 2011. Uterine Artery Embolization versus Myomectomy: Impact on Quality of Life-Results of the FUME (Fibroids of the Uterus: Myomectomy versus Embolization) Trial. *Cardiovasc Intervent Radiol*.

Mara, M., J. Maskova, Z. Fucikova, D. Kuzel, T. Belsan, *et al.* 2008. Midterm clinical and first reproductive results of a randomized controlled trial comparing uterine fibroid embolization and myomectomy. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 31(1):73-85.

Maruo, T., N. Ohara, J. Wang, H. Matsuo, 2004. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update* 10(3): 207-220.

Marchand, L. L., L. R. Wilkens, L. N. Kolonel, B. E. Henderson, 2005. The MTHFR C677T polymorphism and colorectal cancer: the multi-ethnic cohort study. *Cancer epidemiology, biomarkers & Prevention* 14(5): 1198-1203.

Marshall, L. M., D. Spiegelman, M. B. Goldman, J. E. Manson, G. A. Colditz, *et al.* 1998. A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 70(3): 432-439.

Martins, R. A. R., 2014. Papel da variação polimórfica em genes de proteínas da via oxidativa de transformação dos estrogénios nos fibromiomas uterinos. Tese de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa, Lisboa.

Matos, A., J. Moutinho, D. Pinto, R. Medeiros, 2005. The influence of smoking and other cofactors on the time to onset to cervical cancer in a southern European population. *Eur. J. Cancer Prev.* 14: 485-491.

Mattila, J. and A. Thomas, 2014 Nitric Oxide Synthase: Non-Canonical Expression Patterns. *Front Immunol* 5:478.

Matsuo, H., O. Kurachi, Y. Shimomura, T. Samoto, 1999. Molecular bases for the actions of ovarian sex steroids in the regulation of proliferation and apoptoses of human uterine leiomyoma. *Oncology*; 57(2): 49-58.

Mavrellos, D., J. Ben-Nagi, T. Holland, W. Hoo, J. Naftalin, *et al.* 2010. The natural history of fibroids. *Ultrasound obstet gynecol* 35: 238-242.

Medeiros, R., A. Morais, A. Vasconcelos, S. Costa, S. Carrilho, *et al.* 2003. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the shedding of circulating tumor cells in the blood of prostate cancer patients, *Cancer Lett* 189(1): 85-90.

Medeiros, R., A. Morais, A. Vasconcelos, S. Costa, D. Pinto, *et al.* 2001. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and genetic susceptibility to prostate cancer. *Eur J. Cancer Prev*; 11: 343-350.

Melillo, G., T. Musso, A. Sica, L. S. Taylor, G. W. Cox, *et al.* 1995. A hypoxiaresponsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter, *J. Exp. Med.* 182: 1683-1693.

Miller, J. W., M. R. Nadeau, J. Smith, D. Smith, J. Selhub, 1994. Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem J.* 298:415-9.

Mirabello, L., M. Yeager, M. Cullen, J. F. Boland, Z. Chen, *et al.* 2016. Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women. *JNCI J Natl Cancer Inst* 108(9): djw100.

Moncada, S. and A. Higgs, 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl J. Med* 329: 2002-2012.

Morton, C. C., 1998. Many tumors and many genes: Genetics of uterine leiomyomata. *Am J. Pathol*; 153(4): 1015-1020.

Muñoz, N., X. Castellsagué, A. de Gonzalez, L. Gissmann, 2006 Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24: S1-S10.

Munger, K., A. Baldwin, K. M. Edwards, H. Hayakawa, C. L. Nguyen, *et al.* 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.* 78(21): 11451-60.

Murad, F., 1999. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signalling. *Biosci Rep* 19: 133-154.

McLucas, B., L. Adler, R. Perrella, 2001. Uterine fibroid embolization: nonsurgical treatment for symptomatic fibroids. *J. Am Coll Surg.* 192(1): 95-105.

Nathan, C. and Q. Xie, 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 78:915-918.

Narisawa-Saito, M. and T. Kiyono, 2007. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 98(10):1505-11.

Nayar, R. and D. C. Wilbur, 2015. The pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathol* 123(5): 271-281.

Nikolic, B., J. B. Spies, M. J. Lundsten, S. Abbara, 2000. Patient Radiation Dose Associated with Uterine Artery Embolization. *Radiology* 214: 121-125.

Oh, N., K. Ryu, C. Jung, S. Y. Yi, S. Kim, 2013. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the uterus of patients with leiomyoma or adenomyosis. *J. Obstet Gynaecol Res* 39(2): 536-542.

Okolo, S., 2008. Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 22(4): 571-588.

Parker, W. H., 2007. Etiology, symptomatology and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril*; 87(4): 725-736.

Parazzini, F., 2006. Risk factors for clinically diagnosed uterine fibroids in women around menopause. *Maturitas*; 55(2): 174-179.

Pelage, J. P., O. Le Dref, P. Soyer, M. Kardache, H. Dahan, *et al.* 2000. Fibroid-related menorrhagia: treatment with superselective embolization of the uterine arteries and midterm follow-up. *Radiology* 215: 428-431.

Pereira, T. V., M. Rudnicki, B. M. Y. Cheung, L. Baum, Y. Yamada, *et al.* 2007. Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. *J. Hypertens* 25: 1763-1774.

Piyathilake, C. J., M. Macaluso, G. L. Johanning, M. Whiteside, D. C. Heimbürger, *et al.* 2000. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res* 20(3): 1751-1757.

Pisco, J., M. Duarte, T. Bilhim, F. Cirurgião, A. Oliveira, 2011. Pregnancy after uterine fibroid embolization. *Fertil Steril* 95(3): 1121.e5–1121.e8.

Pisco, J. M., Duarte, M., Bilhim, T., Tinto, H. R., 2010. Embolização de fibromiomas uterinos em 882 pacientes (único centro). *Salutis Scientia* 2: 16-21.

Powers, H. J., 2005. Interaction among folate, riboflavin, genotype and cancer with reference to colorectal and cervical cancer. *J. Nutr.* 135:2960S-2966S.

Potischman N, Brinton LA, 1996. Nutrition and cervical neoplasia. *Cancer Causes Control.* 7(1):113–26.

Prabhudas, R. R., 2013. Determinantes genéticos na fisiopatologia da asma. Tese de Mestrado em Biologia Molecular e Genética. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Pron, G., J. Bennett, A. Common, J. Wall, M. Asch, *et al.* 2003. The Ontario Uterine Fibroid Embolization Trial. Part 2. Uterine fibroid reduction and symptom relief after uterine artery embolization for fibroids. *Fertil Steril* 79(1): 120-7.

Radić, S., Z. Stanojević, B. Dindić, 2004. The pathogenesis of neoplasia. *Arch Oncol* 12(1): 35-37.

Ramírez-Patiño, R., L. E. Figuera, A. M. PueblaPérez, J. I. Delgado-Saucedo, M. M. Legazpi-Macias *et al.* 2013, Intron 4 VNTR (4a/b) polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with breast cancer in Mexican women, *J. Korean Med. Sci.* 28: 1587–1594.

Ramkaran, P., A. Phulukdaree, S. Khan, D. Moodley, A. A. Chuturgoon, 2015. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with increased risk of coronary artery disease in young South African Indians. *Gene* 571(1): 28-32.

Rampersaud, G. C., G. P. Kauwell, A. D. Hutson, J. J. Cerda, L. B. Bailey, 2000. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J. Clin Nutr*; 72:998–1003.

Ravina, J. H., A. Aymard, N. Ciraru-Vieneron, J. Clerissi, J. J. Merland, 2003. Uterine fibroids embolization: results about 454 cases. *Gynecol Obstet Fertil* 31: 597-605.

Ravina, J. H., N. C. Vigneron, A. Aymard, O. Le Dref, J. J. Merland, 2000. Pregnancy after embolization of uterine myoma: report of 12 cases. *Fertil Steril* 73:1241-3.

Ravina, J. H., D. Herbreteau, N. Ciraru-Vigneron, J. M. Bouret, E. Houdart, *et al.* 1995. Arterial embolisation to treat uterine myomata. *Lancet* 9: 671-72.

Rein, M. S., R. L. Barbieri, A. J. Friedman, 1995. Progesterone: A critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am J. Obstet Gynecol* 172: 14-8.

Richards, P. A., P. D. Richards, A. J. Tiltman, 1998. The ultrastructure of fibromyomatous myometrium and its relationship to infertility. *Hum Reprod Update* 4(5): 520-525.

Roura, E., X. Castellsagué, M. Pawlita, N. Travier, T. Waterboer, *et al.* 2014. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. *Int. J. Cancer*, 135: 453–466.

Robinson, L. J., S. Weremowicz, C. C. Morton, T. Michel, 1993. Isolation and Chromosomal Localization of the Human Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS3) Gene. *Genomics* 19: 350-357.

Rosl, F., A. Arab, B. Klevenz, H. Zur Hasen, 1993. The effect of ADN methylation on gene regulation of human papillomaviruses. *J. Gen Virol* 74:791-801.

Ross, R. K., M. C. Pike, M. P. Vessey, D. Bull, D. Yeates, *et al.* 1996. Risk factors for uterine fibroids: reduced risk associated with oral contraceptives. *Br Med J.* 359-362.

Ryk, C., N. Wiklund, T. Nyberg, P. De Verdier, 2011. Ser608Leu polymorphisms in the nitric oxide synthase-2 gene may influence urinary bladder cancer pathogenesis. *Scand J. Urol Nephrol* 45: 319-325.

Saura, M., C. Zaragoza, B. Herranz, M. Grier, L. Diez-Marqués, *et al.* 2005. Nitric oxide regulates transforming growth factor- β signalling in endothelial cells. *Circ. Res.* 97: 1115-1123.

Sabry, M., A. Al-Hendy, 2012. Innovative oral treatments of uterine leiomyoma. *Obstet Gynecol Int Vol* 2012.

Safarinejad, M. R., S. Safarinejad, N. Shafiei, 2013. Effects of the T-786C, G894T, and intron 4 VNTR (4a/b) polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene on the risk of prostate cancer. *Urol Oncol*; 31(7): 1132-1140.

Safarinejad, M. R., N. Shafiei, S. Safarinejad, 2010. The role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, G894T, and 4a/b gene polymorphisms in the risk of idiopathic male infertility. *Mol Reprod Development* 77: 720-727.

Sankaran, S, I. T. Manyonda, 2008. Medical management of fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet and gynaecol*; 22(4): 655-676.

Saslow, D., D. Solomon, H. W. Lawson, M. Killackey, S. L. Kulasingam, *et al.* 2012. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. *Am J. Clin Pathol* 137: 516-542.

Sarkodie, B. D., B. O. Botwe, D. N. Adjei, E. Ofori, 2016. Factors associated with uterine fibroid in Ghanaian women undergoing pelvic scans with suspected uterine fibroid. *Fertility Research and Practice* 2:9.

Sedjo, R. L., P. Inserra, M. Abrahamsen, R. B. Harris, D. J. Roe, *et al.* 2002. Human papillomavirus persistence and nutrients involved in the methylation pathway among a cohort of young women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11:353-9.

Sena-Martins, M., C. M. Roteli-Martins, V. Tadini, G. A. De Souza, N. Kisilevsky, *et al.* 2003. Uterine artery embolization for the treatment of symptomatic myomas in Brazilian women. *São Paulo Med. J.* 121 (5): 185-190.

Silva, J., F. Cerqueira, J. Ribeiro, H. Sousa, T. Osório, R. Medeiros, R., 2013. Is Chlamydia trachomatis related to human papillomavirus infection in young women of Southern European population? A self-sampling study. *Arch Gynecol Obstet* 288(3): 627-33.

Simms-Stewart, D. and H. Fletcher, 2012. Counselling patients with uterine fibroids: a review of the management and complications. *Obstet Gynecol Int* 539365. doi: 10.1155/2012/539365.

- Sipola, P., A. Ruuskanen, L. Yawu, M. Husso, R. Vanninen, *et al.* 2010. Preinterventional quantitative magnetic resonance imaging predicts uterus and leiomyoma size reduction after uterine artery embolization. *J. Magn Reson Imaging*. 31(3): 617-24.
- Souto, J. C., F. Blanco-Vaca, J. M. Soria, A. Buil, L. Almasy, *et al.* 2005. A Genomewide Exploration Suggests a New Candidate Gene at Chromosome 11q23 as the Major Determinant of Plasma Homocysteine Levels: Results from the GAIT Project. *Am. J. Hum. Genet.* 76:925–933.
- Somigliana, E., P. Vercelline, R. Daginati, R. Pasin, O. De Giorgi, *et al.* 2007. Fibroids and female reproduction: a critical analysis of the evidence. *Hum Reprod Update* 13(5): 465-476.
- Sulaiman, S., A. Khaund, N. McMillan, J. Moss, A. Lumsden, 2003. Uterine fibroids – do size and location determine menstrual blood loss? *Reprod Biol* 115: 85-89.
- Su, M., S. Lin, Y. Chen, 2011. Genetic association studies of angiogenesis and vasoconstriction related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Human Reprod Update* 17(6):803-12.
- Schiffman, M., P. E. Castle, J. Jeronimo, A. C. Rodriguez, S. Wacholder, 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370(9590):890-907.
- Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, P. M. Howley, 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63(6):1129-36.
- Sharp, L. and J. Little, 2004. polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review *Am. J. Epidemiol.* 159(5): 423-443.
- Snijders, P., R. Steenbergen, D. Heideman, C. Meijer, 2006. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J. Pathol* 208: 152-164.
- Spies, J. B., J. Bruno, F. Czeyda-Pommersheim, S. T. Magee, S. A. Ascher, *et al.* 2005. Long-term outcome of uterine artery embolization of leiomyomata. *Obstet Gynecol* 106: 933-939.
- Spies, J. B., S. A. Ascher, A. R. Roth, J. Kim, E. B. Levy, *et al.* 2001. Uterine artery embolization for leiomyomata. *Obstet Gynecol* 98(1): 29-34.
- Stanley, M., 2016. Preventing cervical cancer and genital warts – How much protection is enough for HPV vaccines? *Hot Topics In Infection And Immunity In Children – Papers from the 13th annual ICC meeting, Oxford, UK, 2015. J. Infect* 72(5): S23-28.
- Stanley, M., 2010 Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* 117: S5-S10.
- Steinmetz, K. and J. D. Potter, 1996. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. *J. Am Diet Assoc.* 96:1027–37.

Stovall, D. W., S. B. Parrish, B. J. Van Voorhis, S. J. Hahn, A. E. T. Sparks, *et al.* 1998. Uterine leiomyomas reduce the efficacy of assisted reproduction cycles: results of a matched follow-up study. *Hum. Reprod.* 13(1): 192-197.

Schwartz, S. M., 2001. Epidemiology of uterine leiomyomata. *Clin Obstet Gynecol* 44(2): 316-326.

Stewart, E. A., 2001. Uterine fibroids. *The Lancet* 357(9252): 293-298.

Stroes, E. S. G., E. E. van Faassen, M. Yo, P. Martasek, P. Boer, R. Govers, *et al.* 2000. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ. Res.* 86: 1129-1134.

Tal, R. and J. H. Segars, 2013. The role of angiogenic factors in fibroid pathogenesis: potential implications for future therapy. *Hum. Reprod. Update* 20(2): 194-216.

Tsukada, T., K. Yokoyama, T. Arai, F. Takemoto, S. Hara, *et al.* 1998. Evidence of Association of the eNOS Gene Polymorphism with Plasma NO Metabolite Levels in Humans. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 245, 190-193.

Ueland, P. M., S. Hustad, J. Schneede, H. Refsum, S. E. Vollset, 2001. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol. Sci.* 22(4): 195-201.

Ünal, M. T., H. G. Karabulut, G. Gümüş-Akay, Y. Dölen, A. Elhan, *et al.* 2010. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in gastric cancer. *Turk J. Gastroenterol*; 21(4): 338-344.

Vaccarella, S., J. Lortet-Tieulent, M. Plummer, S. Franceschi, F. Bray, 2013. Worldwide trends in cervical cancer incidence: Impact of screening against changes in disease risk factors. *Eur. J. Cancer* 49: 3262-3273.

Vallance, P. and A. Hingorani, 1999. Endothelial nitric oxide in human in health and disease. *Int J. Exp Pathol* 80(6): 291-303.

Van den Donk, M., B. Buijsse, S. W. van den Berg, M. C. Ocke, J. L. Harryvan, *et al.* 2005. Dietary intake of folate and riboflavin, MTHFR C677T genotype, and colorectal adenoma risk: a Dutch case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(6):1562– 6.

Van der Kooij, S. M., W. J. Hehenkamp, N. A. Volkers, E. Birnie, W. M. Ankum, *et al.* 2010. Uterine artery embolization vs hysterectomy in the treatment of symptomatic uterine fibroids: 5-year outcome from the randomized EMMY trial. *Am J. Obstet Gynecol* 203:105.e1-13.

Velebil, P., P. A. Wingo, Z. Xia, L. S. Wilcox, H. B. Peterson, 1995. Rate of hospitalization for gynecologic disorders among reproductive-age women in the United states. *Obstet Gynecol* 86: 764-9.

Vikhlyaeva, E. M., Z. S. Khodzaeva, N. D. Fantschenko, 1995. Familial predisposition to uterine leiomyomas, *Int J. Gynaecol Obstet* 51:127-131.

Vizcaino, A. P., V. Moreno, F. X. Bosch, N. Muñoz, X. M. Barros-Dios, *et al.* 1998. Internacional trends in the incidence of cervical cancer: I. Adernocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 75: 536-545.

Wallach, E. and N. Vlahos, 2004. Uterine myomas: na overview of development, clinical features and management. *Obstet Gynecol* 104(2): 393-406

Wang, J., D. Dudley, X. L. Wang, 2002. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(5): e1-e4.

Walboomers, J., M. Jacobs, M. Manos, F. Bosch, J. Kummer, *et al.* 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol* 189: 12-19.

Walker, W. J., J. P. Pelage, 2002. Uterine artery embolization for symptomatic fibroids: clinical results in 400 women with imaging follow up. *BJOG: Int J. Gynaecol Obstet* 109: 1262-1272.

Walker W. J. and S. J. McDowell, 2006. Pregnancy after uterine artery embolization for leiomyomata: A series of 56 completed pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195: 1266-71.

Watson, G. M. T. and W. J. Walker, 2002. Uterine artery embolization for the treatment of symptomatic fibroids in 114 women: reduction in size of the fibroids and women's views of the success of the treatment. *BJOG: Int J. Gynaecol Obstet* 109: 129-135.

Wei, Q., H. Shen, L. E. Wang, C. M. Duphorne, P. C. Pillow, *et al.* 2003. Association between low dietary folate intake and suboptimal cellular DNA repair capacity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 12:963-9.

Wegienka, G., 2012. Are a uterine leiomyoma a consequence of a chronically inflammatory immune system? *Medical Hypotheses* 79: 226-231.

Weinstein, S.J., R. G. Ziegler, E. A. Frongillo, N. Colman, H. E. Sauberlick, *et al.* 2001. Low serum and red blood cell folate are moderately, but not significantly associated with increased risk of invasive cervical cancer in US women. *J. Nutr.* 131:2040 – 8.

West, C.P., M. A. Lumsden, S. Lawson, J. Williamson, D. T. Baird, 1987. Shrinkage of uterine fibroids during therapy with goserelin (Zoladex): a luteinizing hormone-releasing hormone agonist administered as a monthly subcutaneous depot. *Fertil Steril* 48: 45-51.

Wink, D. A. and J. B. Mitchell, 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25(4-5): 434-56.

Wise, L. A., J. R. Palmer, Y. C. Cozier, M. O. Hount, E. A. Stewart, *et al.* 2007. Perceived racial discrimination and risk of uterine leiomyomata. *Epidemiology* 18(6): 747-757.

Wise, L. A., T. R. Sponholtz, L. Rosenberg, L. L. Adams-Campbell, W. Kuohung, *et al.* 2016. History of uterine leiomyoma and risk of endometrial cancer in black women. *Cancer Causes Control.* 27: 545-552.

Worthington-Kirsch, R. L., G. L. Popky, F. L. Hutchins Jr., 1998. Uterine arterial embolization for the management of leiomyomas: quality-of-life assessment and clinical response. *Radiology* 208:625–629.

Wu X., Z. Wang, Y. XU, R. Ren, B. Heng, Z. Su, 2014. Association between three eNOS polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pac J. Cancer Prev* 15 (13): 5317-5324.

Wynn, T. A. and L. Barron, 2010. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*, 30(3): 245-257.

WHO, 2016. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>, acesso a: 9/10/2016.

WHO, 2016a. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>, acesso a 9/2016.

Yao, L., F. Fang, Y. Zhong, L. Yu, 2010. The association between two polymorphisms of eNOS and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 124: 223-227.

Yang, C., K. Matsuo, H. Ito, M. Shinoda, S. Hatooka, K. *et al.* 2005. Gene environment interactions between alcohol drinking and the MTHFR C677T polymorphism impact on esophageal cancer risk: results of a case-control study in Japan. *Carcinogenesis* 26(7): 1285-1290.

Yazdanpanah, N., A. G. Uitterlinden, M. C. Zillikens, M. Jhamai, F. Rivadeneira, *et al.* 2008. Low dietary riboflavin but not folate predicts increased fracture risk in postmenopausal women homozygous for the MTHFR. *J. Bone Miner* 23 (1): 86-94.

Yoo, K., S. Kim, J. Chung, S. Chang, 2010. Nitric oxide synthase 2 gene polymorphisms are associated with prostatic volume in Korean men with benign prostatic hyperplasia. *Asian J. Androl* 12: 690-696.

Xu, W., L. Z. Liu, M. Loizidou, M. Ahmed, I. G. Charles, 2002. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Research* 12(5-6): 311-320.

Zeidel, A., B. Beilin, I. Yardeni, E. Mayburd, G. Smirnov, *et al.* 2002. Immune response in asymptomatic smokers. *Acta Anaesthesiologica scandinavica* 46(8): 959-964 in Fonseca-Moutinho, 2011. Smoking and cervical cancer. *International Scholarly Research Network ISRN Obstetrics and Gynecology* 2011: 847684.

Ziegler, R. G., S. J. Weinstein, T. R. Fears, 2002. Nutritional and genetic inefficiencies in one-carbon metabolism and cervical cancer risk. *J. Nutr.* 132:2345S-9.

Zimmermann, A., D. Bernuit, C. Gerlinger, M. Schaefers, K. Geppert, 2012. Prevalence, symptoms and management of uterine fibroids: an international internet-based survey of 21,746 women. *BMC Women Health* 12(6): 12-6.

Zoodsma, M., I. M. Nolte, M. Schipper, E. Oosterom, G. van der Steeg, *et al.* 2005. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility for (pre) neoplastic cervical disease. *Hum. Genet.* 116:247–254.

Zhao, W., M. Hao, Y. Wang, N. Feng, Z. Wang, *et al.* 2016. Association between folate status and cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J. Clin Nutr* 70: 837-842.

Zhao, S. Z., J. M. Wong, L. M. Arguelles, 1999. Hospitalization Costs Associated with Leiomyoma. *Clin. Ther.* 21(3): 563-75.

Zhou, S., T. Yi, K. Shen, B. Zhang, F. Huang, *et al.* 2011. Hypoxia: the driving force of uterine myometrial stem cell differentiation into leiomyomas cells. *Med. Hypotheses* 77(6): 985-986.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo I – Imagens Suplementares

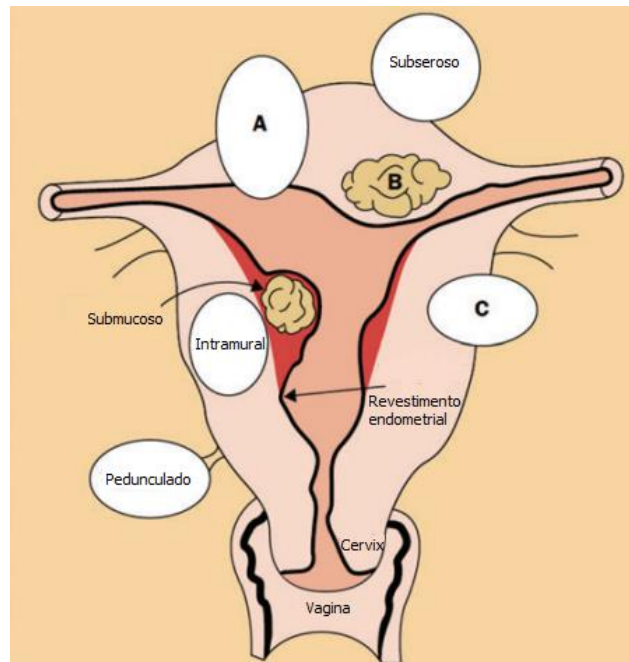


Figura Suplementar 8.1 – Localização dos fibromiomas uterinos. Alguns miomas podem considerar-se uma mistura de tipos, como é ilustrado na imagem (A, B, C) (Adaptado à língua a partir de Stewart, 2001).

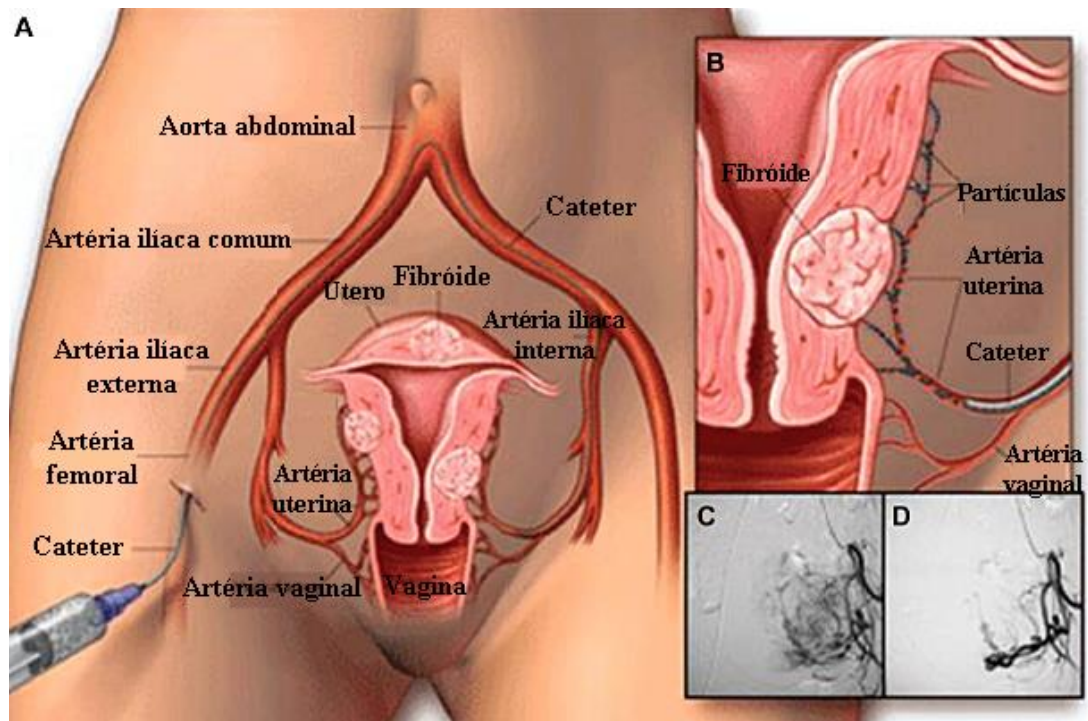


Figura 8.2 - Embolização das artérias uterinas. Através da colocação de um cateter angiográfico nas artérias uterinas via artéria femoral comum, procede-se à injeção de agentes embólicos (por exemplo, partículas de álcool polivinil em ambas as artérias até que o fluxo se reduza. A e B – ilustração da técnica, C – Angiograma que mostra o fluxo sanguíneo antes do procedimento, D – angiograma que demonstra o fluxo sanguíneo após o procedimento (Adaptado à língua de Tropeano *et al.* 2008).

Anexo II – Consentimento Informado

Consentimento Informado e Livre para Testes de Susceptibilidade

A análise de biomarcadores entre eles os genéticos (genoma) que estão envolvidos nas doenças em geral podem ser estudadas e identificadas com o objectivo de determinar as causas genéticas/ susceptibilidade em indivíduos com o diagnóstico clínico de _____, assim como na prevenção de doenças associadas e contribuir para o conhecimento sobre os mecanismos bio fisiopatológicos nas pessoas afectadas ou em risco/ susceptibilidade.

Fui informado(a) de forma adequada e inteligível sobre os mecanismos biológicos da doença, o seu modo de transmissão, o impacto na família, a evolução da sua história natural, a existência de terapêuticas ou intervenções médicas/ cirúrgicas possíveis, assim como a ausência das mesmas.

Decido livremente efectuar ou não efectuar ^(riscar o que não interessa) o estudo de biomarcadores referido, anteriormente.

Para este estudo é necessária a colheita de amostra de sangue, cerca de 2 a 5 ml no total. As amostras colhidas serão utilizadas apenas para o estudo de biomarcadores (genéticos e outros) da doença acima referida

Autorizo a colheita de sangue para estudo de:

- Susceptibilidade ()
- Investigação ()

Autorizo/não autorizo ^(riscar o que não interessa) que o meu nome e informação clínica façam /não façam ^(riscar o que não interessa) parte do registo informático anonimizado do Laboratório de Genética que a amostra de sangue possa/não possa ^(riscar o que não interessa) ser utilizada para investigação desta doença, de forma anonimizada.

Assinatura do consultado/a doente/ CI/familiar
Nome completo

Serviço/Hospital/Unidade de Saúde

Nº do Processo _____ Local _____ data Dia /Mês/Ano ____ / ____ / _____

Nome do Médico

Assinatura _____

Nº Cédula Profissional / Vinheta _____

Anexo III – Protocolos Extração de ADN e tampões de PCR

A. Protocolo de extração pelo método de *Salting-Out*

1. O sangue periférico é colhido num tubo com anticoagulante EDTA.
2. Transfere-se 2mL para um tubo graduado de 10mL.
3. Adiciona-se 1 volume de TKM X-100, por cada volume de sangue.
4. Adiciona-se 25mL de IPGEPAL CA 630 por cada mL de sangue; este componente lisa as células, libertando os componentes intracelulares.
5. O tubo é agitado 4-5 vezes por inversão vigorosa.
6. Segue-se uma centrifugação a 2200rpm, à temperatura de aproximadamente 4°C, durante 15min, que deve ser repetida caso o *pellet* formado não adira ao fundo do tubo.
7. O sobrenadante é rejeitado. Conserva-se o *pellet* que contém, entre outros constituintes, DNA. Adiciona-se 1mL de tampão TKM 1 por cada mL de sangue.
8. Centrifuga-se à mesma temperatura, a 1600rpm e por um período de 10min, descartando-se o sobrenadante.
9. O passo anterior é repetido no máximo 2 vezes, de forma a obter um *pellet* branco, evitando assim perdas excessivas de DNA.
10. Ressuspende-se o *pellet* (vórtex) na solução TKM 2 numa proporção de 160µL de tampão por mL de sangue.
11. Adiciona-se 10µL de SDS 10% por mL de sangue e a mistura é ressuspensa com o auxílio de uma micropipeta. Este reagente dissolve as proteínas ainda existentes em solução.
12. Incuba-se a 55°C durante 10min.
13. Ao fim deste intervalo de tempo o conteúdo do tubo é transferido para um *ependorf* ao qual se adicionam 60µL de NaCl saturado por mL de sangue. Visualiza-se de imediato a precipitação de proteínas existentes na suspensão de DNA que formam uma fase branca opaca distinta de outra completamente transparente (suspensão de DNA); este tubo é agitado através do vórtex.
14. Centrifuga-se (centrífuga de tubos de reacção) a 1200rpm, à temperatura ambiente e por 30min (*salting-out*).
16. Verte-se o sobrenadante, que contém o DNA, resultante da centrifugação anterior para um tubo de vidro e adicionam-se 2 volumes de etanol absoluto gelado (colocado a -20°C, cerca de 5min antes de ser utilizado).
17. O tubo, devidamente selado, é invertido suavemente até precipitação do DNA.
18. Ressuspende-se o DNA em 200µL de tampão TE previamente colocados no tubo de reacção devidamente rotulado e armazena-se a 4°C.

B. Reagentes da extração de ADN

TKMX-100: 2,5 % (v/v) Triton X-100 diluído em tampão TKM1

Tampão TKM1: 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA

Tampão TKM2: 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 0,4 M NaCl
IGEPAL CA-630 - octilfenoxi polietoxietanol (Sigma-Aldrich)

Dodecil sulfato de sódio (SDS- Sodium dodecyl sulfate) a 10%

NaCl 6M

Tampão TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA

Etanol absoluto

C. Tampão de PCR e TAE 10x

<u>Tampão Master Mix (1U/μl)</u> (Thermo Scientific)	DreamTaq DNA Polymerase, 2X DreamTaq Green buffer, dNTPs e 4 mM MgCl ₂
---	---

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012622_PCR_Master_2X_K0171_U_G.pdf

<u>Tampão TAE 10X</u>	48,4g Tris 11,4 mL de ácido acético 37,22g Na ₂ EDTA + 4g NaOH para 200mL H ₂ O
-----------------------	---

Anexo IV - Análise Genética e Tabelas Suplementares

A – Perfil eletroforético do polimorfismo do Intrão 16 (+88G>T) (rs9282801)

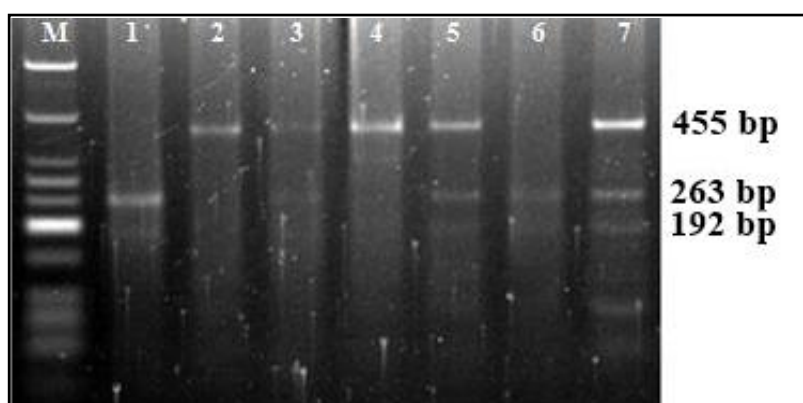


Figura suplementar 8.3 – Perfil eletroforético do polimorfismo presente no intrão 16 do gene NOS2 em gel de agarose. M – marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder 50 bp); 2, 3 e 4 – fenótipo homozigótico sem mutação GG (455 bp); 5 e 7 – fenótipo heterozigótico GT (455 bp + 263 bp + 192 bp); 1 e 6 – fenótipo homozigótico com mutação TT (263 bp + 192 bp) (Prabhudas, 2013).

B – Perfil eletroforético do polimorfismo do Exão 16 (+16C>T) (rs2297518)

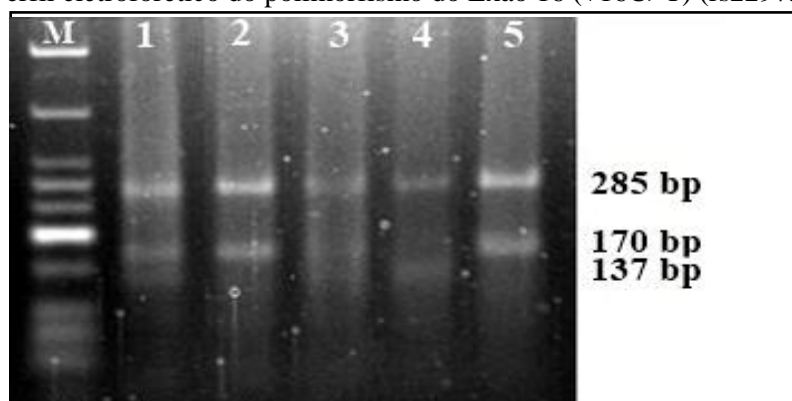


Figura suplementar 8.4 – Perfil eletroforético do polimorfismo presente no exão 16 do gene NOS2 em gel de agarose. M – marcador de peso molecular (DNA Ladder 50 bp); 2 e 5 – fenótipo homozigótico sem mutação CC (285 bp + 170 bp); 1 e 3 fenótipo heterozigótico CT (285 bp + 170 bp + 137 bp + 33 bp); 4 – fenótipo homozigótico com mutação TT (285 bp + 137 bp) (Prabhudas, 2013).

C – Perfil eletroforético do polimorfismo 27-bp VNTR do intrão 4 (4b/a)

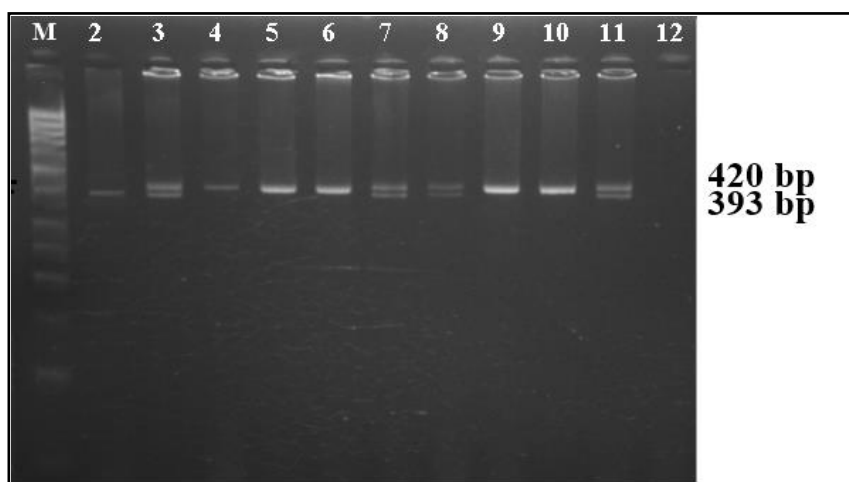


Figura suplementar 8.5 - Perfil eletroforético do polimorfismo 4a/b do gene NOS3, 27bp-VNTR em gel de agarose. M – marcador molecular (GeneRuler™ 50bp DNA ladder Fermentas); 2 – fenótipo homozigótico mutado 4a4a (393 bp); 3, 7, 8, 11 - fenótipo heterozigótico 4b4a (420 bp + 393 bp); 4,5,6,9,10 - fenótipo homozigótico 4b4b (420 bp); 12 – Controlo negativo;

D – Perfil eletroforético do polimorfismo C677T (1801133)

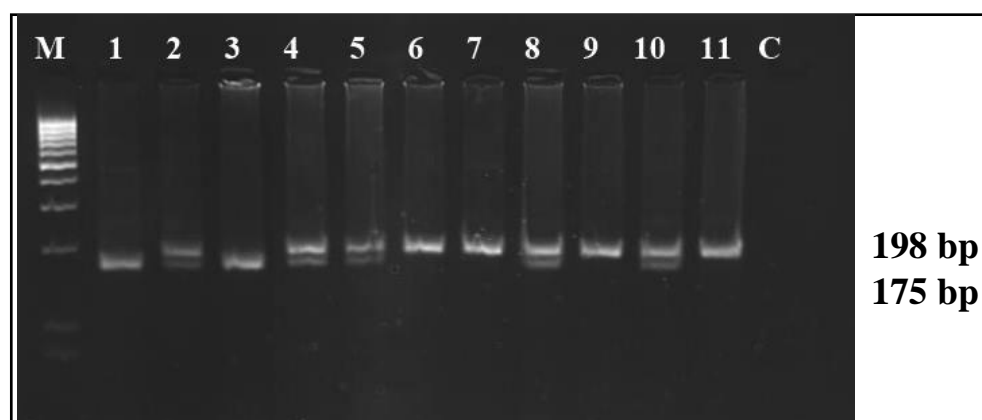


Figura suplementar 8.6 - Perfil eletroforético dos fragmentos do gene MTHFR-RFLP em gel de agarose. M – Marcador (Mass Ruler, DNA Ladder Low range, Fermentas); 1,3 – fenótipo homozigótico mutado TT (175 bp); 2,4,5,8,10 – fenótipo heterozigótico CT (198 bp + 175 bp); 6,7,9,11 – fenótipo homozigótico selvagem CC (198 bp); C – Controlo negativo;

Tabela Suplementar 8.1 Distribuição dos parâmetros clínicos pelos genótipos dos polimorfismos da iNOS/NOS2 e eNOS/NOS3 para a população de mulheres com fibromiomas embolizados.

Polimorfismos		NF			VFD_PRÉ				ISQUEMIA				LFD						
		1	2-4	≥5	P ¹	≤27	28-68	69-162	≥163	P ¹	<90	≥90	P ¹	I	SubS	SubM	I/SubS	I/SubM	P ¹
Intrão 16 +88C>T (rs9282801)	GG	14 (77,8)	7 (58,3)	20 (64,5)	0,41	9 (64,3)	9 (69,2)	11 (73,3)	12 (80)	0,78	9 (81,8)	20 (66,7)	0,48	21 (84)	15 (62,5)	3 (75)	1 (33,3)	1 (50)	<0,001
	GT	3 (16,7)	3 (25)	10 (32,3)		4 (28,6)	2 (15,4)	3 (20)	3 (20)		2 (18,2)	7 (23,3)		4 (16)	9 (37,5)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	
	TT	1 (5,6)	2 (16,7)	1 (3,2)		1 (7,1)	2 (15,4)	1 (6,7)	0 (0)		0 (0)	3 (10)		0 (0)	0 (0)	1 (25)	1 (33,3)	1 (33,3)	
	GG	14 (77,8)	7 (58,3)	20 (64,5)	0,49	9 (64,3)	9 (69,2)	11 (73,3)	12 (80)	0,81	9 (81,8)	20 (66,7)	0,35	21 (84)	15 (62,5)	3 (75)	1 (33,3)	1 (50)	0,25
	GT+TT	4 (22,2)	5 (41,7)	11 (35,5)		5 (35,7)	4 (30,8)	4 (26,7)	3 (20)		2 (18,2)	10 (33,3)		4 (16)	9 (37,5)	1 (25)	2 (66,7)	1 (50)	
Total (100%)		18	12	31		14	13	15	15		11	30		25	24	4	3	2	
Exão 16 +14C>T (rs2297518)	CC	9 (90)	13 (100)	24 (85,7)	0,11	10 (76,9)	14 (100)	12 (92,3)	10 (100)	0,35	8 (100)	22 (88)	0,59	19 (95)	22 (91,7)	3 (100)	1 (100)	3 (5,9)	0,95
	CT	0 (0)	0 (0)	4 (14,3)		2 (15,4)	0 (0)	1 (7,7)	0 (0)		0 (0)	2 (8)		1 (5)	2 (8,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	TT	1 (10)	0 (0)	0 (0)		1 (7,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (4)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	CC	9 (90)	13 (100)	24 (85,7)	0,36	10 (76,9)	14 (100)	12 (92,3)	10 (100)	0,11	8 (100)	22 (88)	0,30	19 (95)	22 (91,7)	3 (100)	1 (100)	3 (5,9)	0,95
	CT+TT	1 (10)	0 (0)	4 (14,3)		3 (23,1)	0 (0)	1 (7,7)	0 (0)		0 (0)	3 (12)		1 (5)	2 (8,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Total (100%)		10	13	28		13	14	13	10		8	25		20	24	3	1	3	
Intrão 4 (a/b) (27bp-VNTR)	bb	15 (57,7)	15 (78,9)	31 (59,6)	0,14	14 (58,3)	15 (60)	15 (65,2)	16 (66,7)	0,88	10 (58,8)	30 (63,8)	0,58	22 (57,9)	24 (58,5)	5 (62,3)	4 (80)	5 (100)	0,73
	ba	9 (34,6)	2 (10,5)	20 (38,5)		8 (33,3)	8 (32)	8 (34,8)	7 (29,2)		7 (41,2)	15 (31,9)		13 (34,2)	15 (36,6)	3 (37,5)	1 (20)	0 (0)	
	aa	2 (7,7)	2 (10,5)	1 (1,9)		2 (8,3)	2 (8)	0 (0)	1 (4,2)		0 (0)	2 (4,3)		3 (7,9)	2 (4,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	bb	15 (57,7)	15 (78,9)	31 (59,6)	0,27	14 (58,3)	15 (60)	15 (65,2)	16 (66,7)	0,92	10 (58,8)	30 (63,8)	0,72	22 (57,9)	24 (58,5)	5 (62,3)	4 (80)	5 (100)	0,38
	ba+aa	11 (42,3)	4 (21,1)	21 (40,4)		10 (41,7)	10 (40)	8 (34,8)	8 (33,3)		7 (41,2)	17 (36,2)		16 (42,1)	17 (41,5)	3 (37,5)	1 (20)	0 (0)	
Total (100%)		26	19	52		24	25	23	24		17	47		38	41	8	5	5	

NF – Número de fibromiomas; **VFD_Pré** – Volume do fibromioma dominante antes da embolização das artérias uterinas; **LFD** – Localização do fibromioma dominante; **I** – Intramural; **SubS** – Subseroso; **SubM** – Submucoso; **I/SubS** – Intramural/Subseroso; **I/SubM** – Intramural/Submucoso; **T** – Total; ¹ Teste do qui-quadrado;

Tabela Suplementar 8.2 Análise da distribuição dos parâmetros clínicos considerados pelos genótipos obtidos para o polimorfismo da MTHFR para a população de mulheres com fibromiomas embolizados.

MTHFR (C667T) (rs180113)	Polimorfismo	NF			VFD_PRÉ				ISQUEMIA			LFD							
		1	2-4	≥5	P ¹	≤27	28-68	69-162	≥163	P ¹	<90	≥90	P ¹	I	SubS	SubM	I/SubS	I/SubM	P ¹
	CC	12 (48)	13 (65)	37 (71,2)	0,06	12 (52,2)	15 (65,2)	16 (66,7)	16 (64)	0,59	11 (68,8)	28 (60,9)	0,85	23 (59)	27 (69,2)	3 (37,5)	4 (80)	3 (50)	0,51
	CT	13 (52)	5 (25)	11 (21,2)		7 (30,4)	7 (30,4)	7 (29,2)	8 (32)		4 (25)	14 (30,4)		12 (30,8)	10 (25,6)	3 (37,5)	1 (20)	3 (50)	
	TT	0 (0)	2 (10)	4 (7,7)		4 (17,4)	1 (4,3)	1 (4,2)	1 (4)		1 (6,3)	4 (8,7)		4 (10,3)	2 (5,1)	2 (25)	0 (0)	0 (0)	
	CC	12 (48)	13 (65)	37 (71,2)	0,14	12 (52,2)	15 (65,2)	16 (66,7)	16 (64)	0,73	11 (68,8)	28 (60,9)	0,57	23 (59)	27 (69,2)	3 (37,5)	4 (80)	3 (50)	0,39
	CT+TT	13 (52)	7 (35)	15 (28,8)		11 (47,8)	8 (34,8)	8 (33,3)	9 (36)		5 (31,3)	18 (39,1)		16 (41)	12 (30,8)	5 (62,5)	1 (20)	3 (50)	
Total (100%)		25	20	52		23	23	24	25		16	46		39	39	8	5	6	

NF – Número de fibromiomas; VFD_Pré – Volume do fibromioma dominante antes da embolização das artérias uterinas; LFD – Localização do fibromioma dominante; I – Intramural; SubS-Subseroso; SubM – Submucoso; I/SubS – Intramural/Subseroso; I/SubM – Intramural/Submucoso; T – Total; ¹ Teste do qui-quadrado;